Aus der Chirurgischen Universitätsklinik Tübingen
Direktor: Prof. Dr. W. Dick

Die Beeinflussung der Blutgerinnung durch den pH-Wert des Blutes

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
CHRISTINE KNOLL
aus Leipzig

7239

1962

Aus der Chirurgischen Universitätsklinik Tübingen
Direktor: Prof. Dr. W. Dick

Die Beeinflussung der Blutgerinnung durch den pH-Wert des Blutes

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
CHRISTINE KNOLL
aus Leipzig

1962

Dekan : Professor Dr. med. K. Brecht
1. Berichterstatter: Dozent Dr. med. P. Matis
2. Berichterstatter: Professor Dr. med. W. Dick

Fotodruck PRÄZIS · Tübingen

MEINEN ELTERN

IN

DANKBARKEIT GEWIDMET

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549608_0011

INHALT

Seite

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG 1

II. EIGENE UNTERSUCHUNGEN 4

A. Material 4
1.) Silikonsieren der Gläser 4
2.) Blutentnahme 4
3.) Plasma 4
4.) Puffer 4
5.) Säuren 5
6.) Fibrinogen 5
7.) Thrombin 5
8.) Heparin 5
9.) Thrombokinase 5
10.) Gerinnungsthermostat 5

B. Methoden 5
1.) Die Rekalzifizierungszeit ($CaCl_2$-Zeit) 5
2.) Die Heparinzeit (sog. Heparintoleranztest in vitro) 6
3.) Die Thromboplastinzeit (sog. Quick-Test) 7
4.) Die Thrombinzeit 8
5.) Die Thrombelstographie 9
6.) Die pH-Messung 10

C. Ergebnisse 11
1.) Einstellung des Plasmas und der Fibrinogenlösung 11
2.) Reaktionszeiten im System Fibrinogen - Thrombin (Thrombinzeit) 17
3.) Reaktionszeiten im Plasma 17
4.) Thrombelastographische Werte 27

III. DISKUSSION 36

IV. ZUSAMMENFASSUNG 41

V. LITERATURVERZEICHNIS 42

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Schon bald nach Erscheinen der grundlegenden Arbeit von A. SCHMIDT, nach der es sich bei der Blutgerinnung um ein Fermentgeschehen handelt, finden sich Untersuchungen über den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Vorgänge der Blutgerinnung.

So fand DEETJEN, daß die Wasserstoffzahl des Blutes von Bedeutung für das Intaktbleiben der Thrombozyten ist. Die Aciditätsabnahme des Blutes nach Austritt aus dem Gefäßsystem durch Entweichen von CO_2 soll zum Zerfall der Plättchen, Abgabe von Thrombokinase an das Plasma und damit zur Gerinnung führen. Bei Berührung des Blutes mit Glas werde der Zerfall durch Abgabe von Alkali begünstigt, während sich die Plättchen mit Quarzglas besser konservieren ließen. Durch Auffangen des Blutes in Kohlensäure-Luft-Gemischen soll sich die Gerinnung verzögern lassen, am stärksten, wenn das Gemisch 12 - 15 Vol.% CO_2 enthält.

Die Beeinflussung der Gerinnung durch die CO_2-Spannung des Blutes untersuchte auch CHIO. Auch er fand eine starke Verlangsamung der Gerinnung durch CO_2, bei einer Mischung von O_2 und CO_2 und 30 - 50 mm Hg CO_2. CHIO erklärt seine Ergebnisse damit, daß von der CO_2-Spannung des Blutes das Gleichgewicht der Kalkverbindungen und damit die Bildung des Thrombins abhänge.

KUGELMASS, STUBER und LANG fanden eine Abnahme des pH-Wertes bei der Gerinnung von rekalzifiziertem Oxalatplasma und bei der Gerinnung von Fibrinogen mit Schmidt'schem Thrombin. Sie erklärten diese Tatsache durch Adsorption von H-Ionen an flockende Eiweißkörper und weisen darauf hin, daß dieses Phänomen für die Gerinnung nicht spezifisch sei, sondern eine ganz allgemeine Erscheinung in flockenden Systemen. Die H-Ionenadsorption wäre nur ein sekundärer Vorgang, damit auch die Alkalisierung des Milieus. Keinerlei Schluß ließe sich jedoch dadurch auf die Reaktionen ziehen, die zu dieser Flockung geführt hätten.

Die Einwirkung von Säuren und Laugen auf die Fibringerinnung des Thrombins untersuchten HERZFELD und KLINGER. Sie unterschieden bei ihren Versuchen zwischen Thrombinentstehung und Thrombinwirkung. Für die Thrombinbildung fanden sie eine optimale Reaktion um den Neutralpunkt oder in schwach "bikarbonatalkalischem" Gebiet. Säuren hemmten in kleinen Dosen schon die Thrombinbildung. Bei der Thrombinwirkung erwies sich die alkalische Reaktion hemmend, während Zusatz von Säuren fördernd war.

Einen Vergleich von Thrombingerinnung und Hitzekoagulation des

Fibrinogens in Abhängigkeit vom pH-Wert führte WÖHLISCH durch. Er fand, daß die Thrombingerinnung des Fibrinogens am schnellsten bei neutraler oder schwach saurer Reaktion verläuft.

Die Abhängigkeit der Gerinnungszeit vom Bikarbonatgehalt und der CO_2-Spannung des Blutes hat BAUMBERGER untersucht. Er fand, daß die Gerinnung mit steigendem Bikarbonatgehalt langsamer verläuft, ebenso durch Steigerung der CO_2-Spannung. BAUMBERGER zieht aus diesen Ergebnissen den Schluß, daß es eine für die Blutgerinnung optimale CO_2-Spannung geben muß. Er gibt jedoch nicht an, welchem pH-Wert des Blutes diese optimale CO_2-Spannung entspricht.

WIDENBAUER und REICHEL untersuchten die Einwirkung der Kohlensäure auf die Blutgerinnung, ausgehend von folgender Arbeitshypothese: Tritt das Blut aus den Gefäßen aus, so gibt es rasch Kohlendioxyd an die Umgebung ab. In dieser plötzlichen Änderung der Gasspannung- der Partialdruck der Kohlensäure fällt dadurch im Blut rasch ab, vermutet WIDENBAUER einen Hauptfaktor zur Auslösung der Blutgerinnung. WIDENBAUER und REICHEL konnten feststellen, daß rekalzifiziertes Oxalatplasma unter einem Druck von 40 mm Hg CO_2 nicht gerann. Nach Aufheben des CO_2-Druckes trat innerhalb von zwei bis vier Min. die Gerinnung ein. - Ferner untersuchten dieselben Verfasser die Wirkung der Kohlensäure auf die Blutthrombokinase wie folgt: Bei Einwirkung von 40 mm Hg CO_2 auf ein rekalzifiziertes Oxalatplasma, dem Blutthrombokinase zugesetzt wurde, kam es nach zwei Stunden noch zu keiner Gerinnung. Nach Aufheben des CO_2-Druckes erreichten die Gerinnungszeiten langsam fallend wieder den Ausgangswert. Diese reversible Inaktivierung konnte noch einige Male hintereinander wiederholt werden.

Die Verfasser vermuten, daß es sich bei dieser sogenannten reversiblen Inaktivierung der Gerinnung durch Kohlensäure nicht um die Wirkung einer Veränderung des pH-Wertes durch die Kohlensäure handelt, sondern um Bindung des Kohlendioxyds an den Eiweißkomplex.

Auf Grund dieser Ergebnisse mißt WIDENBAUER der Kohlensäure für die Flüssigerhaltung des Blutes in den Gefäßen eine große Bedeutung zu. Das Absinken der Kohlensäure im extravasalen Blut soll den Gerinnungsvorgang einleiten.

Diese Versuche von WIDENBAUER und REICHEL wurden von MARX und BAYERLE wiederholt, sie erhielten folgende Ergebnisse: Zusatzloses Blut wurde nur wenig in seiner Gerinnungszeit verändert, wenn es sofort nach der Entnahme aus der Vene in ein Glasgefäß gebracht wurde, das unter einem Druck von 40 mm Hg CO_2 stand. Nach Ablauf der Gerinnung fanden die Verfasser einen pH-Wert des Serums von pH 7,5 statt pH 8,0 ohne Einwirkung von Kohlendioxyd.

Bei Oxalatblut und -plasma fanden sie nur eine deutliche Verlängerung der Gerinnungszeit, wenn es vor der Rekalzifizierung einige Minuten einem Druck von 40 - 50 mm Hg CO_2 ausgesetzt war. Wurde es gleichzeitig mit der Rekalzifizierung einige Minuten einem Druck von 40 - 50 mm Hg CO_2 ausgesetzt, trat keine Gerinnungsverlängerung ein.

Auch für die Thromboplastinzeit eines Oxalatplasmas unter 50 mm Hg CO_2 (fünf Min.) fanden die Verfasser Werte, die nur einige Sekunden länger waren, als die Thromboplastinzeit eines Plasmas unter 40 mm Hg CO_2.

Der pH-Wert des Oxalblutes und des Oxalplasmas war jedesmal deutlich in den sauren Bereich verschoben, bis pH 6,2.

Die Verfasser sahen nie Unterinnbarkeit von Nativ- oder Oxalatblut, das einem CO_2-Druck von 50 mm Hg CO_2 ausgesetzt war.

Nachdem eine Verlängerung der Gerinnungszeit unter CO_2-Einwirkung stets mit starken Verschiebungen des pH-Wertes unter pH 7,0 begleitet war, versuchten die Verfasser den Verlängerungseffekt dadurch zu erklären. Zu diesem Zweck stellten sie Oxalatplasmen mit Essigsäure auf verschieden starke pH-Stufen ein und bestimmten die Rekalzifizierungs- und Thromboplastinzeit. Unterhalb von pH 7,0 waren die Rekalzifizierungszeiten deutlich verlängert. Mit gereinigtem Prothrombin nach SEEGERS, SMITH und BRINKHOUS prüften die Verfasser die Abhängigkeit der 1. Phase der Blutgerinnung vom pH-Wert des Blutes.

Sie fanden eine Abhängigkeit der Prothrombinumwandlung durch Thrombokinase und Ca vom pH-Wert, mit einem Optimum bei pH 7,0.

Die kurze, auf ältere Arbeiten zurückgreifende Einleitung zeigt deutlich, daß die Bedeutung des pH-Wertes bei der Blutgerinnung schon frühzeitig erkannt und untersucht wurde. An dieser Stelle wurde bewußt auf neuere Arbeiten verzichtet, da diese auch noch bei der Besprechung der einzelnen Ergebnisse angeführt werden müssen.

Mir war die Aufgabe gestellt worden, unter standardisierten Bedingungen festzustellen, wie die wichtigsten Reaktionszeiten, die im Rahmen alltäglicher Gerinnungsanalysen ausgeführt werden, vom aktuellen pH-Wert beeinflußt werden. Es war hierbei besonderer Wert auf einen Vergleich der Ergebnisse der einzelnen Methoden zu legen.

II. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A Material

Die Blutgerinnung wird nicht nur durch spezifische Proteine, die Gerinnungsfaktoren, beeinflußt, sondern auch durch unspezifische, physikalisch-chemische Faktoren. Aus diesem Grund spielt z.B. die Beschaffenheit der Oberfläche eine Rolle, mit der das Blut vor der Gerinnung in Berührung kommt. Um bei sämtlichen Versuchen eine einheitliche Oberflächenbeschaffenheit zu gewährleisten, wurden für die folgenden Versuche silikonisierte Glasgefäße verwendet.

1.) Silikonisieren der Gläser: Zunächst müssen die Gläser vollständig entfettet werden. Dies geschieht durch Einlegen in 33%ige Natronlauge, anschließend in 33%ige Schwefelsäure, jeweils 24 Stunden. Danach werden die Gläser gründlich mit Wasser abgespült und im Trockenschrank getrocknet. Die Innenfläche der Gläser wird dann mit einer Lösung aus 1 Teil Silikonöl (Wacker Chemie) und 49 Teilen Tetrachlorkohlenstoff benetzt. Das Silikonöl wird durch Erhitzen auf 250 °C eingebrannt. So vorbereitete Gläser können jeweils nur für eine Bestimmung verwendet werden.

2.) Blutentnahme: Um das Blut in seiner natürlichen Gerinnungsfähigkeit nicht mehr als nötig zu beeinflussen, ist eine äußerst schonende Blutentnahme erforderlich. Die Vena cubitalis wird mit einer konuslosen, innen polierten Kanüle aus V_2A-Stahl punktiert. Von dem austretenden Blut verwirft man mindestens den ersten ml, um Beimengungen von Gewebsthrombokinase zu vermeiden. 9 ml Blut werden in einem silikonisierten Zentrifugenglas aufgefangen, in dem sich 1 ml 3,8%ige Natriumzitratlösung befindet. Also Mischungsverhältnis Blut : Natriumzitratlösung = 9 : 1. Sofort nach der Entnahme wird das Glas einmal vorsichtig gekippt. Schütteln ist unbedingt zu vermeiden!

3.) Plasma: Nach ELLERBROOK, RAMSDEN, REES und BROWN geben Proben eines bei - 20°C eingefrorenen Zitratplasmas während neun Monaten fast gleiche Thromboplastinzeiten. Aus diesem Grund und um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, führten wir die folgenden Bestimmungen im Plasma einer Versuchsperson aus, das in Einzelportionen aufgeteilt, bei - 20°C eingefroren und aufbewahrt wurde. Das Plasma wurde nach schonendster Blutentnahme (s.o.) 10 Min. bei 3 000 U/Min. abzentrifugiert und sofort eingefroren. Um konstante Werte zu erhalten ist es unbedingt erforderlich, immer auf dieselbe Weise aufzutauen: Nach der Entnahme aus der Tiefkühltruhe läßt man das Plasma genau 40 Min. bei Zimmertemperatur stehen, kippt einmal vorsichtig um und führt sofort anschließend die Gerinnungsbestimmungen aus.

4.) Puffer: Verwendet wurden 1/15 molare Phosphatpuffer (Merck, Faktor 1,0

und Veronal-Salzsäurepuffer.

5.) Säuren: Um die spezifische Wirkung einer Säure auszuschalten, wurde der pH-Wert mit vier verschiedenen Säuren eingestellt, mit: Essigsäure, Milchsäure, Oxalsäure und Salzsäure. Die ersten drei der angeführten Säuren lagen als 1%ige Lösung in 0,9%iger NaCl-Lösung vor, während von der Salzsäure, als der stärksten Säure, eine 1/4%ige Lösung in 0,9%iger NaCl-Lösung verwendet wurde. Die einzelnen Säuren hatten einen pH-Wert von:

1%ige Essigsäure = pH 3,0
1%ige Milchsäure = pH 2,5
1%ige Oxalsäure = pH 1,7
1/4%ige Salzsäure = pH 1,7

Von diesen Ausgangslösungen wurde eine fortlaufende Verdünnungsreihe mit 0,9%iger NaCl-Lösung hergestellt, bis zu einer Verdünnung von 2^{-11}%.

6.) Fibrinogen: Verwendet wurde Fibrinogen der Behringwerke.

7.) Thrombin: Topostasin Roche der Deutschen Hoffmann La Roche.

8.) Heparin: Reagens für Heparintoleranztest der Deutschen Hoffmann La Roche AG. Der Inhalt einer Ampulle (10 IE/ml) wird in 5 ml m/40 $CaCl_2$-Lösung gelöst. Von dieser Lösung werden 0,15 ml zu 0,85 ml m/40 $CaCl_2$-Lösung pipettiert = 0,15 E Heparin.

9.) Thrombokinase: Kaninchenhirn-Thrombokinase der Behringwerke.

10.) Gerinnungsthermostat: Für die Bestimmungen wurde der Gerinnungsthermostat nach JÜRGENS und BELLER verwendet. Als Wasserbad dient ein rechteckiges Glasgefäß, die Temperatur wird durch einen Thermostaten konstant gehalten und ist genau einstellbar. Ein am Glasgefäß angebrachter Synchronmotor versetzt einen Metallstab, an dessen Ende sich ein Gummistopfen befindet, in gleichmäßige Drehungen. Das Reagenzglas mit dem Gerinnungssubstrat wird am Gummistopfen befestigt und taucht in das Wasserbad ein. Im Gerinnungssubstrat befindet sich eine kleine Bleikugel. Die Gerinnung ist eingetreten, wenn die Bleikugel durch das entstandene Gerinnsel vom Reagensglasboden abgehoben wird.

B Methoden

1.) Die Rekalzifizierungszeit ($CaCl_2$-Zeit): Die Bestimmung der Rekalzifizierungszeit ist heute weitgehend an die Stelle der alten Metho-

den zur Bestimmung der Gesamtgerinnungszeit getreten, z.B. der Methode nach BÜRKER.

Diese Methode wird dadurch abgeändert, daß man Blut bei der Entnahme durch Zugabe von Natriumzitrat oder -oxalat ungerinnbar macht. Später kann dann die Gerinnung unter optimalen Bedingungen ausgelöst werden durch die Zugabe von m/40 $CaCl_2$-Lösung.

Durch die Verwendung von venösem Zitrat- oder Oxalatblut wird die Beimengung von Gewebssaft und damit von Thrombokinase vermieden, wie es bei Verwendung von Kapillarblut unvermeidbar ist. Außerdem wird die Gerinnungszeit in einen günstigen Meßbereich herabgedrückt. (Normalwerte 70 - 120 Sek., wenn das Plasma 10 Min. bei 3 000 U/Min. zentrifugiert wird). Es wird die Zeit gemessen, die nötig ist, um dekalzifiziertes Blut nach Zugabe von $CaCl_2$-Lösung zur Gerinnung zu bringen. Die Messung erfolgt im Wasserbad von 37°C, die zugegebene Menge $CaCl_2$ ist jeweils konstant.

Ausführung: 0,1 ml Zitratplasma + 0,1 ml NaCl- oder Säurelösung werden in ein Reagensglas pipettiert und eine Min. im Wasserbad von 37°C vorgewärmt. Dann kommen 0,2 ml m/40 $CaCl_2$-Lösung dazu, ebenfalls vorgewärmt. Die Reaktionszeit wird von der Zugabe der $CaCl_2$-Lösung bis zum Eintritt der Gerinnselbildung gemessen. Erkennung des Gerinnungseintrittes durch das Anheben der Bleikugel im Reaktionsgemisch.

2.) Die Heparinzeit (sog. Heparintoleranztest in vitro):
Bei dieser Methode handelt es sich um die Bestimmung der Rekalzifizierungszeit nach Zugabe einer bestimmten Menge Heparin.
Erstmals wurde die Heparinzeit nach Heparinbelastung des Organismus, d.h. nach i.v. Injektion einer bestimmten Heparinmenge von DE TAKATS bestimmt. WAUGH und RUDDIK bestimmten die Heparinzeit in vitro, nach Zugabe einer bestimmten Heparinmenge zum Reaktionsgemisch. Auf diese Weise wird eine Verlängerung der Reaktionszeit erreicht und Kompensationsvorgänge des Gerinnungssystems können nicht wirksam werden; eine überdeckte Hyper- oder Hypokoagubilität kommt besser zum Ausdruck. SIGG spricht von einer Gerinnung im Zeitlupentempo. In der Folgezeit wurde die Methode von mehreren Autoren verbessert, z.B. von SIGG. Besonders häufige Anwendung findet die Modifikation nach SOULIER. Hierbei werden steigende Verdünnungen einer Heparinlösung zu verschiedenen Oxalatplasmaproben gegeben und die Rekalzifizierungszeit bestimmt. Die Heparinzeit kann auch im Vollblut bestimmt werden, z.B. bei der Modifikation nach MARBERT und WINTERSTEIN.
Wir haben den Test in der von MATIS, MEYER und MÖRL angegebenen Modifikation ausgeführt.

Ausführung: 0,1 ml Zitratplasma + 0,1 ml NaCl- oder Säurelösung werden in ein Reagensglas pipettiert und eine Min. im Wasserbad von 37°C vorgewärmt. Dann kommen 0,2 ml der Heparin-$CaCl_2$-Lösung dazu. Die Erkennung des Gerinnungseintrittes erfolgt durch Anheben der Bleikugel im Reaktionsgemisch.

3.) die Thromboplastinzeit (sog. Quick-Test): Während bei der Rekalzifizierungszeit und der Heparinzeit alle Phasen der Gerinnung erfaßt werden, werden mit der Thromboplastinzeit Veränderungen in der Vorphase oder in der 1. Phase der Gerinnung nicht bestimmt. Die Thromboplastinzeit stellt somit nur ein Maß für den Gehalt des Blutes an Prothrombin, Faktor II, V, VII und X dar, nicht aber ein Maß für die Aktivität der Blutthrombokinase bildenden Faktoren VIII, IX und Plättchenfaktor 3.

Gibt man dem Gerinnungssubtrat gleichzeitig mit der Rekalzifizierung Thrombokinase im Überschuß zu, so werden alle Faktoren von der Reaktion ausgeschlossen, die an der Bildung der sog. Gewebsthrombokinase beteiligt sind. Dadurch wird die Gerinnungszeit sehr stark verkürzt.

Die Bedeutung der Thromboplastinzeit liegt darin, daß sie unter anderem bei Abfall der Faktoren II und VII, den man mit Cumarinderivaten künstlich herbeiführen kann, verlängert ist. Deshalb eignet sich die Bestimmung der Thromboplastinzeit zur Kontrolle der Antikoagulantientherapie.

Eine wichtige Rolle spielt die Art der verwendeten Thrombokinase. Sie muß:
1.) eine genügend große und konstante Aktivität besitzen und
2.) eine optimale Breite haben.
Darunter versteht man die Differenz zwischen der Thromboplastinzeit des unverdünnten und eines auf 25% verdünnten Plasmas. Diese Breite ist für jede Thrombokinase verschieden. Bei zu geringer Thromboplastinzeitbreite wirken sich methodische Fehler sehr stark aus. Da die bestimmte Thromboplastinzeit (z.B. 20" oder 25") sehr stark von der verwendeten Thrombokinase abhängt, kann man mit einer solchen Zeitangabe allein wenig anfangen. Vergleichbare Werte erhält man erst dadurch, daß man ein Bezugsystem in Form einer Normalplasma-Verdünnungsreihe, sog. Eichkurve herstellt. Der Verlauf dieser Kurve hängt wieder stark von der verwendeten Thrombokinase ab. Bei Wechsel der Thrombokinase oder der Charge muß deshalb eine neue Eichkurve hergestellt werden.
Herstellung der Eichkurve: Zunächst wird eine Verdünnungsreihe nach folgendem Schema angesetzt:

0,2 ml Plasma + 0,0 ml Fibrinogenlösg.	0,18 ml Plasma + 0,02 ml Fibrinogenlösg.	0,02 ml Plasma bis + 0,18 ml Fibrinogenlösg.

Von jeder Verdünnung wird die Thromboplastinzeit bestimmt und der Wert in ein Koordinatensystem eingetragen. Aus der Eichkurve kann dan aus der Reaktionszeit (Sek.) der entsprechende Wert in % Verdünnung eines Normalplasmas = Quickwert abgelesen werden.

QUICK verwendete ursprünglich zur Verdünnung des Plasmas 0,9%ige NaCl-Lösung. Dadurch kommt es aber bei stärkeren Verdünnungen zu einem starken Fibrinogendefizit und schon zu dadurch bedingten Veränderungen der Gerinnungszeit. Bei der Bestimmung der Thromboplastinzeit sollen aber nur das Prothrombin mit seinen Acceleratoren und Inhibitoren erfaßt werden, nicht Veränderungen im Fibrinogengehalt des Plasmas. Deshalb verwendet man zur Verdünnung besser eine Fibrinogenlösung (KOLLER und FRICK). Zu diesem Zweck werden je 60 mg Fibrinogen in 10 ml 0,9%iger NaCl-Lösung aufgelöst.

Ausführung: 0,1 ml Plasma + 0,1 ml 0,9%ige NaCl- oder Säurelösung werden in ein Reagensglas pipettiert und eine Min. im Thermostaten vorgewärmt. Dazu kommen 0,4 ml Thrombokinase-$CaCl_2$-Lösung. Erkennung des Gerinnungseintrittes durch das Anheben der Bleikugel im Reaktionsgemisch.

4.) Die Thrombinzeit: Das Reaktionsgemisch wird durch Zugabe von reinem Thrombin zur Gerinnung gebracht. Dabei ist die Zugabe von Calcium nicht mehr erforderlich. Mit der Thrombinzeit wird das Antithrombin und das Fibrinogen mit seinem Hemmsystem bestimmt. Die Bestimmung kann auch mit Fibrinogenlösung durchgeführt werden, dann wird nur noch die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin erfaßt.

Auflösung des Topostasins (Thrombin) in Aqua dest. Wir haben nach MATIS diese Lösung auf 19" eingestellt; d.h. so lange, bis 0,2 ml Plasma oder 0,2 ml Fibrinogenlösung + 0,2 ml Topostasinlösung eine Thrombinzeit von 19" ergeben. Da die Topostasinlösung ihre Aktivität relativ schnell verliert, muß sie während der Bestimmungen in Eis aufbewahrt und gegebenenfalls neu eingestellt werden.

Ausführung: 0,1 ml Plasma oder 0,1 ml Fibrinogenlösung + 0,1 ml 0,9%ige NaCl- oder Säurelösung werden in ein Reagensglas pipettiert und eine Min. im Thermostaten vorgewärmt. Dazu kommen 0,2 ml Topostasinlösung. Erkennung des Gerinnungseintrittes durch das Anheben der Bleikugel im Gerinnungssubstrat.

5.) Die Thrombelastographie: Bei dieser Methode handelt es sich wieder um eine Bestimmung der Gesamtgerinnungszeit. Die üblichen Untersuchungsmethoden, wie z.B. der Heparintoleranztest oder die Rekalzifizierungszeit sagen über die Qualität, den Aufbau des Endproduktes der Gerinnung, das Gerinnsel, nichts aus. Um aber Aussagen über die Funktionstüchtigkeit des gebildeten Gerinnsels machen zu können, muß man die Eigenschaften des gebildeten Fibringerinnsels beurteilen können. Von Bedeutung ist seine Festigkeit, seine Elastizität und die strukturelle Verknüpfung der gebildeten Fibrinfasern im Gerinnsel. Die erste Beschreibung der Thrombelastographie stammt von HARTERT (1949). Einzelheiten über die Mehtode können dort nachgelesen werden.

Arbeitsweise: Nach den ersten Versuchen HARTERTS (1948) sollte zur Messung nur zusatzloses Venenblut verwendet werden. Parallelversuche mit Venenblut und mit gleichzeitig abgenommenem Zitratplasma, ergaben zwar nicht dieselben, aber fast annähernd gleichlaufende thrombelastographische Meßergebnisse (HARTERT 1952). Aus diesem Grund verwendete HARTERT in seinen späteren Arbeiten häufig auch Zitratplasma. Oxalatplasma hat sich wegen stärkerer Schädigung der Erythrocyten nicht bewährt (HARTERT 1952).

Die Blutentnahme erfolgt wie S. 4 beschrieben. Für die Gerinnungsbestimmungen mit dem Thrombelastographen kann eingefrorenes Plasma nicht verwendet werden, da durch diesen Prozeß die Thrombocyten zu stark geschädigt werden. Aus diesem Grund wurde für die folgenden Versuche jedesmal frisches Plasma verwendet. Um nicht allzugroße Abweichungen durch unterschiedliches Plasma zu erhalten, wurde für alle Bestimmungen Blut einer Versuchsperson verwendet. Das Plasma wird durch schwaches Zentrifugieren (5 Min. bei 800 U/Min.) gewonnen, um eine Veränderung der Ergebnisse durch Thrombozytenverlust zu vermeiden. Plasma, das älter als 10 Stunden ist, ist für thrombelastographische Messungen nicht mehr zu gebrauchen.

Ausführung und Auswertung: 0,3 ml Zitratplasma werden in die Küvette pipettiert und eine Min. im Thermostaten vorgewärmt, dann werden 0,06 ml einer isotonischen $CaCl_2$-Lösung dazugegeben (1,29%) und das Ganze mit Paraffinöl überschichtet. Dadurch wird der Zutritt von Luft verhindert.

Die Reaktionszeit r: Man versteht darunter die Zeit, die von der Rekalzifizierung bis zur Verbreiterung der Kurvenschenkel um 1 mm vergeht. Sie kennzeichnet die Zeit bis zum Gerinnungseintritt. Da die Papiergeschwindigkeit bei der Registrierung 2 mm/Min. beträgt, mißt man die entsprechende Strecke in mm und teilt das Ergebnis durch zwei. So erhält man die Reaktionszeit r in Min. Dazu muß noch die Zeit addiert werden, die von der Rekalzifizierung bis zum Beginn der Registrierung verstreicht, bei unseren Versuchen waren dies

30".

Die Gerinnselbildungszeit k: Darunter versteht HARTERT die Zeit, die von Ende der Reaktionszeit bis zum Erreichen einer Amplitude a = 20 mm verstreicht. Sie stellt ein Maß dar für die Geschwindigkeit, mit der sich ein Gerinnsel von bestimmter Festigkeit bildet. Man bestimmt die Stelle der Kurve, bei der a = 20 mm ist, gemessen von äußeren Rand der oberen zum inneren Rand der unteren Kurve. Man zieht eine Senkrechte durch diesen Punkt und mißt deren Abstand von der durch den Endpunkt der Reaktionszeit r gelegten Senkrechten. Der Abstand in mm durch zwei geteilt ergibt den Wert k in Min. Die maximale Thrombuselastizität m_E: Man mißt dabei die maximale Amplitude der Kurve in der auf S.10 angegebenen Weise. Die Messung dieser Größe wurde bei den folgenden Versuchen so modifiziert, daß die Amplitude der Kurve jeweils nach 1/2, 1 und nach 2 Stunden gemessen wurde.

6.) Die pH-Messung: Der Blut-pH-Wert des Menschen wird in engen Grenzen konstant gehalten, mit einem Mittelwert bei pH 7,41. Auch in pathologischen Fällen kommen kaum größere Abweichungen als pH 0,2 - 0,3 von diesem Mittelwert vor. Zur Bestimmung von Blut-pH-Werten ist daher ein pH-Meter von hoher Meßgenauigkeit erforderlich.

Für die vorliegenden, im Plasma ausgeführten Messungen, wurde die Glaselektrode der Firma Metrohm und als Meßgerät das Hämoxitensiometer 2 nach BARTELS verwendet.

Mit dem Hämoxitensiometer 2 wird die elektromotorische Kraft (EMK) der Glaselektrode nach dem Prinzip der Poggendorf'schen Kompensationsschaltung gemessen (stromlose Messung). Die Messung erfolgt in mV.

Nur nach vorherigen Eichungen mit Vergleichslösungen von bekanntem pH-Wert können Glaselektroden zur pH-Messung verwendet werden. Die pH-Werte von Eich- und Meßlösung sollen dabei nahe beieinander liegen.

Zum Eichen wurden 1/15 molare Phosphatpuffer (S. 4) verwendet. Der pH-Wert kann hierbei durch verschiedene Mischungsverhältnisse von primärem und sekundärem Phosphat variiert werden.

Lösung A (primäres Phosphat) enthält 9,078 g KH_2PO_4 im Liter.
Lösung B (sekundäres Phosphat) enthält 11,876 g Na_2HPO_4 im Liter.

Die pH-Werte der Phosphatpuffermischungen wurden den Geigy-Tabellen entnommen. Da sich die Angaben in diesen auf 20 ^{o}C beziehen, die pH-Messung aber bei 37 ^{o}C erfolgte, wurde der Temperaturfaktor bei der Rechnung berücksichtigt. Der pH-Unterschied derselben Puffermischung beträgt im Mittel 0,0017 pH/1 Grad Temperaturänderung (BARTELS, LUNGENFUNKTIONSPRÜ-

FUNG).

Folgende Phosphatpuffermischungen wurden zum Eichen verwendet:

Lösung A ml	Lösung B ml	pH-Werte bei 37 °C
96,9 "	3,1 "	5,368
88,0 "	12,0 "	5,968
73,8 "	26,2 "	6,368
50,0 "	50,0 "	6,768
28,0 "	72,0 "	7,168
13,0 "	87,0 "	7,568

Für jeden pH-Wert erhält man den entsprechenden Wert in mV. Beide Werte werden in ein Koordinatensystem eingetragen. Aus der so erhaltenen Eichkurve können die gesuchten pH-Werte der unbekannten Lösung direkt abgelesen werden.

C. Ergebnisse

1.) Einstellung des Plasmas und der Fibrinogenlösung

Da mir die Aufgabe gestellt war, verschiedene Reaktionszeiten in ihrer Beeinflußbarkeit durch den pH-Wert zu bestimmen und zu vergleichen, mußte das zu diesem Zweck verwendete Plasma und die Fibrinogenlösung auf verschiedene pH-Werte eingestellt werden.

An Plasma verwendeten wir Gefrierplasma (S. 4) und Frischplasma für die thrombelastographischen Untersuchungen (S. 9).

Die Fibrinogenlösung wurde hergestellt, indem je 60 mg Fibrinogen (S. 5) in 5 ml 0,9%iger NaCl-Lösung und 5 ml Veronalpuffer pH 7,4 aufgelöst wurden. Dadurch stellten wir die Fibrinogenlösung auf einen Ausgangs-pH-Wert von pH 7,4 ein, der etwa dem Normalplasma entspricht.

Die Einstellung verschiedener pH-Werte erfolgte mit Veronalpuffern (S. 5) und mit angeführten Säuren (S. 5).

Es wurde von jeder der zur pH-Einstellung verwendeten Säuren eine fortlaufende Verdünnungsreihe hergestellt, ausgehend von der 1%igen Lösung bei Essigsäure, Milchsäure und Oxalsäure und der 1/4%igen Lösung der Salzsäure. Es wurde bis zu einer Verdünnung von 2^{-11}% des jeweiligen Ausgangswertes der einzelnen Säuren

verdünnt, so daß wir folgende Säurekonzentrationen für Essigsäure, Milchsäure und Oxalsäure verwendeten:

$2^{0}\%$; $2^{-1}\%$; $2^{-2}\%$; $2^{-3}\%$; $2^{-4}\%$; $2^{-5}\%$
$2^{-6}\%$; $2^{-7}\%$; $2^{-8}\%$; $2^{-9}\%$; $2^{-10}\%$; $2^{-11}\%$; $2^{-12}\%$;

Bei Salzsäuren verwendeten wir:

$2^{-2}\%$; $2^{-3}\%$; $2^{-4}\%$; $2^{-5}\%$; $2^{-6}\%$; $2^{-7}\%$; $2^{-8}\%$;
$2^{-9}\%$; $2^{-10}\%$; $2^{-11}\%$; $2^{-12}\%$; $2^{-13}\%$;

Von jeder einzelnen dieser Säurekonzentrationen wurde 0,1 ml zu 0,1 ml aufgetautem Gefrierplasma, bzw. 0,1 ml Frischplasma und 0,1 ml Fibrinogenlösung gegeben und der pH-Wert im Versuchsansatz bestimmt, von jedem einzelnen Versuchsansatz je drei Mal. Im Einzelnen wurde so vorgegangen, daß für die pH-Messung mit einer Säure, z.B. Essigsäure und aufgetautem Gefrierplasma, Frischplasma und Fibrinogenlösung für jede einzelne der drei Meßreihen jeweils eine neue Portion Gefrierplasma aus der Tiefkühltruhe geholt wurde. Bei der pH-Einstellung mit Frischplasma wurde für jede Meßreihe Blut abgenommen und das Plasma wie beschrieben gewonnen. Die Fibrinogenlösung wurde für jede Meßreihe neu hergestellt. Die Säureverdünnungen wurden nur einmal hergestellt und für alle drei Messungen verwendet.

Das Auftauen des Gefrierplasmas, die Blutentnahme und die Herstellung der Fibrinogenlösung erfolgte unter denselben Bedingungen, wie bei der Ausführung der Gerinnungsbestimmungen.

Diese Maßnahmen waren nötig, da es unmöglich war, die Messung des pH-Wertes gleichzeitig mit der Bestimmung der Reaktionszeiten auszuführen. Die zur pH-Messung verwendeten Säurelösungen wurden bei $+4^{o}$C im Eisschrank aufbewahrt und zur pH-Einstellung bei Bestimmung der Reaktionszeiten verwendet. Laufende pH-Kontrollen der Säurelösungen ergaben, daß sich diese während vier Wochen nicht veränderten. In dieser Zeit konnte die Bestimmung aller ausgeführten Reaktionszeiten bei pH-Einstellung mit einer Säure abgeschlossen werden.

pH-Kontrollen der einzelnen Proben des Gefrierplasmas, des Frischplasmas und der mit Veronalpuffer pH 7,4 eingestellten Fibrinogenlösungen ergaben konstante Werte. Es war auffallend, daß die durchschnittlichen pH-Werte für Gefrierplasma bei pH 7,5 lagen, gegenüber pH 7,4 bei Frischplasma.

Die Mittelwerte aus den jeweiligen Messungen für Gefrierplasma + Säure, Frischplasma + Säure und Fibrinogenlösung + Säure wurden in ein Koordinatensystem eingetragen (Abb. 1, 2 und 3).

Vergleicht man die so erhaltenen Kurven miteinander, so sieht man daraus, daß die einzelnen Säuren durch das Plasma verschieden stark abgepuffert werden. Besonders auffallend ist dieser Unterschied bei Salzsäure und Oxalsäure, deren Ausgangslösungen beide denselben pH-Wert haben.

Dies ist aber keine Folge besonderer Puffereigenschaft des Plasmas, sondern Folge der unterschiedlichen molaren Konzentration der Säuren. Die selben Kurvenverläufe findet man auch bei Veronalpuffern, nur daß hier in diesem Fall die Pufferkapazität eher erschöpft ist, (vgl. Fibrinogen pH-Werte, Kurve 3).

Betrachtet man nämlich nicht die pH-Werte der Ausgangslösungen, sondern ihre N o r m a l i t ä t e n , so ergeben sich folgende Werte:

1%ige Essigsäure = 0,166 n
1%ige Milchsäure = 0,11 n
1%ige Oxalsäure = 0,22 n
1/4%ige Salzsäure = 0,07 n

Es zeigt sich, daß die verwendete Oxalsäure ungefähr dreimal so stark ist, wie die verwendete Salzsäure. Dies erklärt die unterschiedlichen Pufferkurven der beiden Säuren. Dasselbe gilt, nur nicht so ausgeprägt, für Essigsäure und Milchsäure. Die erste ist um ein Drittel konzentrierter und wird deshalb bis etwa pH 5,2 schwächer abgepuffert.

Ebenfalls beeinflußt wird die Blutgerinnung durch die I o n e n s t ä r k e . Sie ist ein Maß für die Wirksamkeit einzelner Ionen auf Proteine in Lösungen (Aktivität von Enzymen, Löslichkeit von Proteinen) und wird definiert durch die Formel:

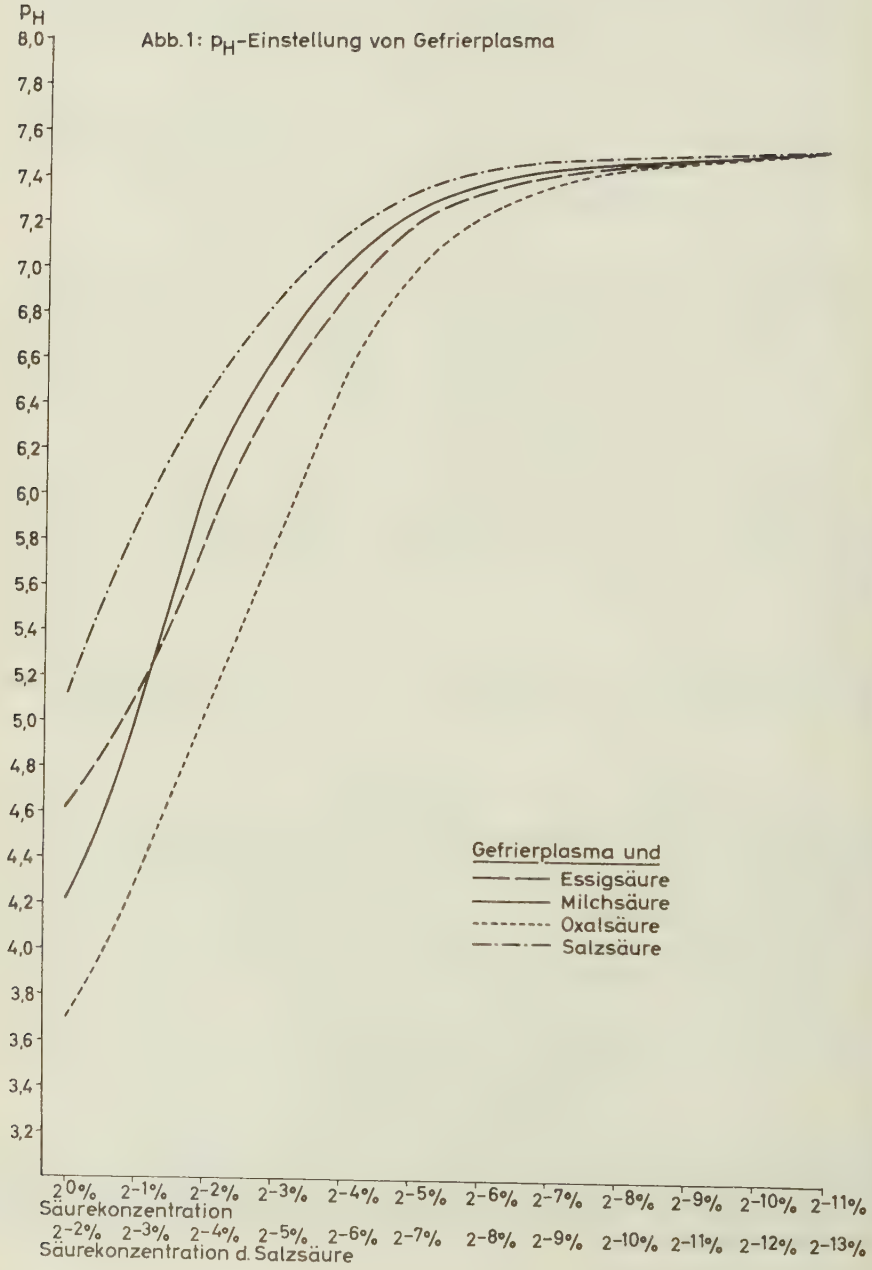
$$I = (c \times w^2),$$

wobei c = Konzentration in Mol, w = Wertigkeit ist.
Der Einfluß der Ionenstärke auf die Blutgerinnung macht sich aber erst bei höheren molaren Konzentrationen bemerkbar. Wir erhielten bei pH-Einstellung mit 1/4%iger Essigsäure und Milchsäure und mit 1/8%iger Oxalsäure und Salzsäure eben noch Gerinnung, bei höheren Konzentrationen trat Ungerinnbarkeit ein. Diese Prozentwerte entsprechen folgenden M o l a r i t ä t e n :

1/4%ige Essigsäure = 0,415 m
1/4%ige Milchsäure = 0,030 m
1/8%ige Oxalsäure = 0,055 m
1/8%ige Salzsäure = 0,010 m

In diesem Molaritätsbereich spielen Unterschiede in der Ionenstärke eine so geringe Rolle, daß wir diesen Faktor bei pH-Einstellung mit den verwendeten Säurelösungen vernachlässigen konnten.

Abb.1: p_H-Einstellung von Gefrierplasma



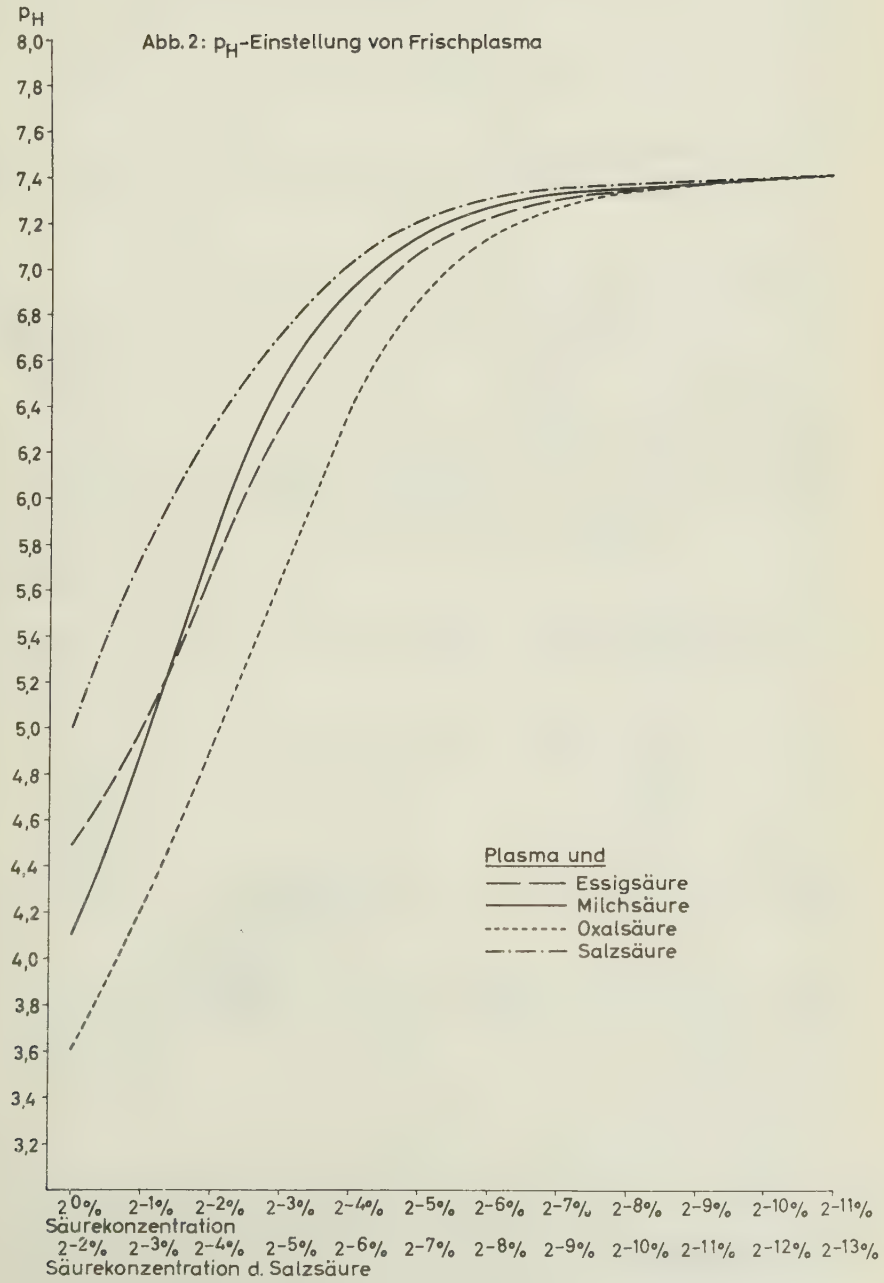


Abb. 2: p_H-Einstellung von Frischplasma

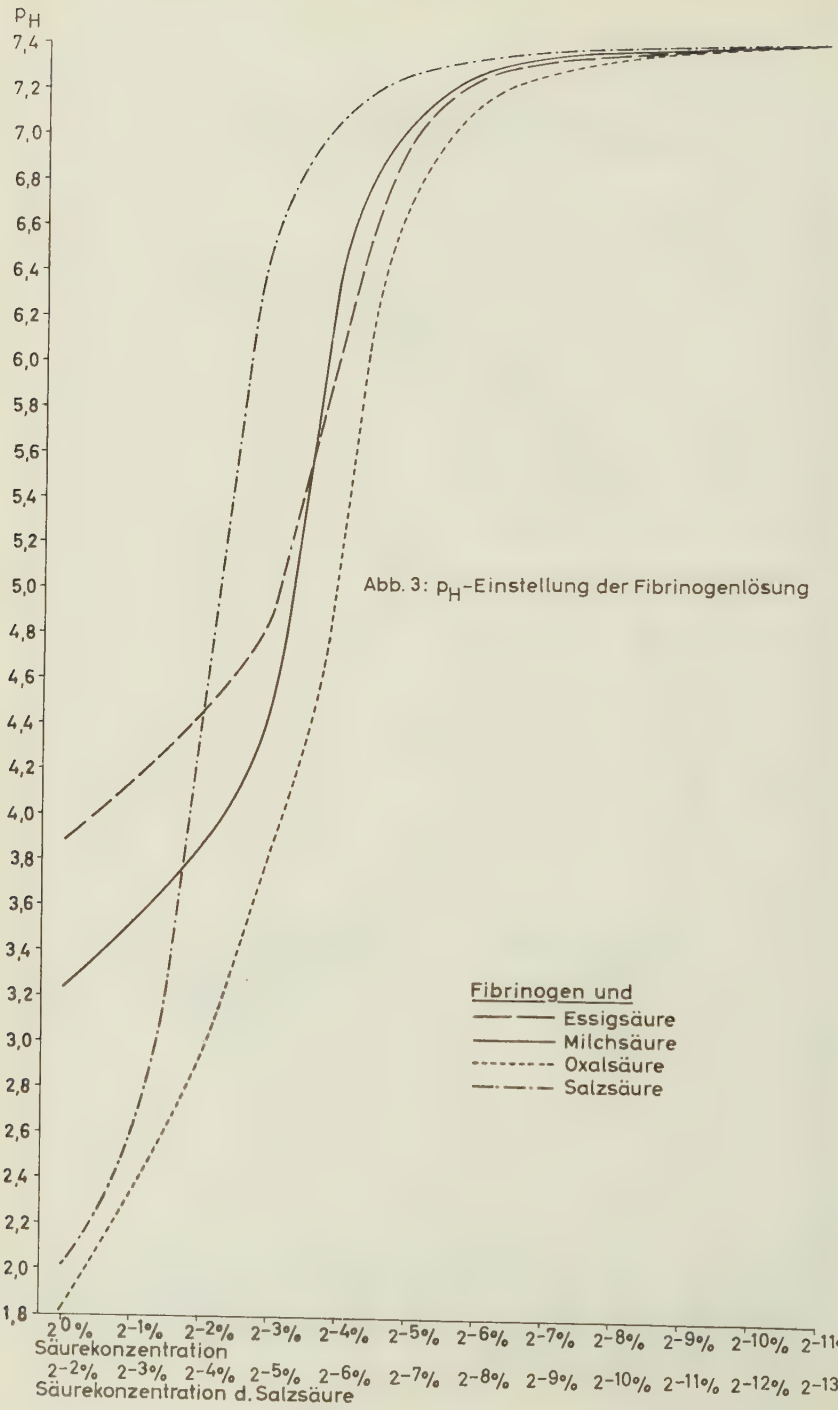


Abb. 3: p_H-Einstellung der Fibrinogenlösung

Die ebenfalls zur pH-Einstellung verwendeten Veronalpuffer besitzen im Bereich von pH 6,8 - 8,0 dieselbe Ionenstärke, sodaß sie für biochemische Untersuchungen besonders geeignet sind.

2.) Reaktionszeiten im System Fibrinogen - Thrombin (Thrombinzeit)

Der Einfluß des pH-Wertes auf die Gerinnung des Fibrinogens durch Thrombin ist häufig untersucht worden, hier hat besonders die Lage des pH-Optimums interessiert.

SCHULZ fand das Gerinnungsoptimum bei pH 6,48; KUGELMASS bei pH 7,0; KUWASHIMA bei pH 6,6; TSUNOO bei pH 6,4 - 6,6. WÖHLISCH fand ein Optimum bei "fast neutraler, ganz schwach saurer Reaktion". Auch HERZFELD und KLINGER fanden bei "schwach saurer Reaktion" eine deutliche Verstärkung der Thrombinwirkung. Nach EAGLE liegt sowohl das Wirkungsoptimum des Thrombins, als auch das der fibrinkoagulierenden Schlangengifte bei pH 6,4 - 6,6. CRUT findet ein Wirkungsoptimum für Thrombin im "schwach alkalischen Gebiet", zwischen pH 7,0 - 8,0. SEEGERS und SMITH fanden bei Einstellung verschiedener pH-Werte mit Imidazolpuffern ein breites pH-Optimum zwischen pH 6,8 - 8,5. Unter pH 4,5 und über pH 10,0 fand Denaturierung statt.

Die Ergebnisse im System Fibrinogen-Thrombin sind aus Abb. 4 ersichtlich. Herstellung der Fibrinogenlösung und pH-Messung S. 11 und S. 10. Die pH-Einstellung erfolgte mit:

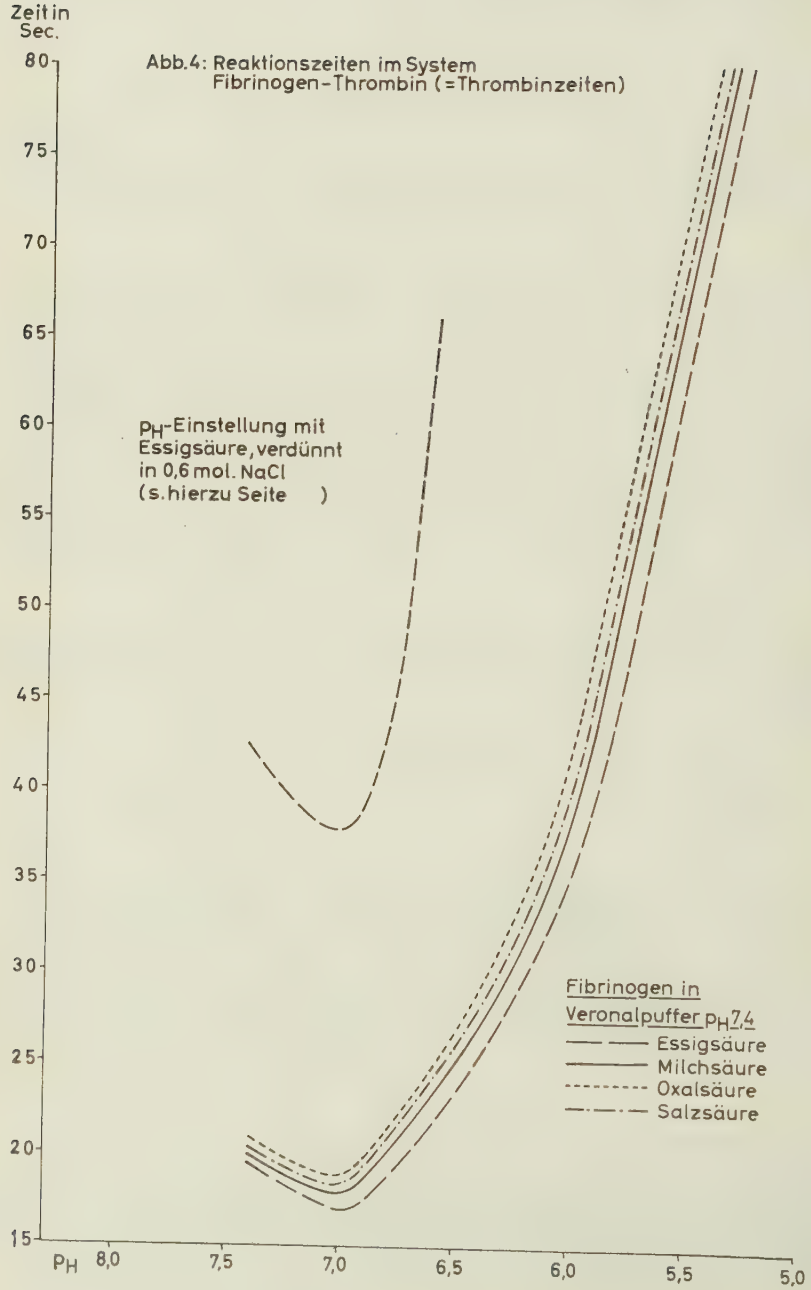
Milchsäure:	Optimale	Gerinnung	bei	einem	pH	von	6,98
Essigsäure:	"	"	"	"	"	"	7,02
Oxalsäure:	"	"	"	"	"	"	7,00
Salzsäure:	"	"	"	"	"	"	7,00

Danach liegen bei unseren Bestimmungen im System Fibrinogen-Thrombin die kürzesten Reaktionszeiten (Thrombinzeiten) bei einem pH-Wert von pH 7,0.

Je weiter der pH-Wert in den sauren Bereich verschoben wird, desto länger werden die entsprechenden Reaktionszeiten, bis schließlich, übereinstimmend bei pH-Einstellung mit allen vier Säuren, ungefähr ab pH 5,0 keine Gerinnung mehr eintritt.

3.) Reaktionszeiten im Plasma

Für die Bestimmung der Heparinzeit, der Rekalzifizierungszeit, der Thromboplastinzeit und der Thrombinzeit wurde Gefrierplasma verwendet(S. 4). Da nach Auftauen dieses Plasmas die Reaktionszeiten laufend zunehmen, wurde zur Kontrolle dieser Gerinnungs-


Zeit in Sec.
80
75
70
65
60
55
50
45
40
35
30
25
20
15
pH 8,0
7,5
7,0
6,5
6,0
5,5
5,0
Abb.4: Reaktionszeiten im System Fibrinogen-Thrombin (=Thrombinzeiten)
pH-Einstellung mit Essigsäure, verdünnt in 0,6 mol. NaCl (s. hierzu Seite)
Fibrinogen in Veronalpuffer pH 7,4
Essigsäure
Milchsäure
Oxalsäure
Salzsäure

änderung nach je zwei Bestimmungen die Reaktionszeit von 0,1 ml Plasma + 0,1 ml 0,9%iger NaCl-Lösung bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden bei der Rekalzifizierungszeit, der Heparinzeit und der Thrombinzeit in % der Kontrollwerte (= NaCl anstatt Säure im Ansatz) umgerechnet. Die Thromboplastinzeiten wurden als Quickwerte anhand entsprechender Eichkurven registriert.

Die Thromboplastinzeiten und Thrombinzeiten für 0,1 ml Plasma und 0,1 ml 0,9%ige NaCl-Lösung änderten sich innerhalb einer Woche nicht, so daß hier keine laufenden Kontrollbestimmungen erforderlich waren, da die Messungen in dieser Zeit abgeschlossen werden konnten.

Die Reaktionszeiten in Sek. für das Ausgangssubstrat von 0,1 ml Gefrierplasma + 0,1 ml 0,9%iger NaCl-Lösung, $\hat{=}$ pH 7,5, betrugen gleich zu Versuchsbeginn (Mittelwerte aller drei Messungen): Thromboplastinzeit: 24" $\hat{=}$ 70%; Thrombinzeit (geeicht): 19"; Rekalzifizierungszeit: 85,5"; Heparinzeit: 162,5" .

Der Gerinnungseintritt, der besonders bei der Bestimmung der Heparinzeit im Frischplasma schlecht zu erkennen ist, war bei Gefrierplasma deutlich zu erfassen. Bei der Rekalzifizierungszeit erfolgte die Gerinnung en bloc, die Werte der einzelnen Bestimmungen wichen kaum voneinander ab, so daß die einzelnen Zeiten sehr genau bestimmt werden konnten.

Da bei der verwendeten Modifikation zur Bestimmung der Heparinzeit nur kleine Mengen Heparin zugegeben wurden, und die Reaktionszeiten deshalb nicht allzu lang wurden, war auch bei dieser Bestimmung der Zeitpunkt des Gerinnungseintrittes deutlich zu erkennen. Auf diese Weise konnten methodische Fehler weitgehend ausgeschaltet werden.

Die jeweiligen Reaktionszeiten bei Bestimmung der Heparinzeit, der Rekalzifizierungszeit, der Thromboplastinzeit und der Thrombinzeit wurden je drei Mal ermittelt und auf den jeweils mitbestimmten Leerwert umgerechnet. Dadurch ist es möglich, die Ergebnisse der einzelnen Gerinnungsbestimmungen miteinander zu vergleichen. Für die Thromboplastinzeit wurden die %-Werte der entsprechenden Eichkurve entnommen (S. 7).

Von den je drei Messungen der pH-Werte und der Reaktionszeiten wurden die Mittelwerte bestimmt und diese in ein Koordinatensystem eingetragen. Aus den so erhaltenen Kurven kann das genaue pH-Optimum für die einzelnen Reaktionszeiten direkt abgelesen werden (Abb. 5, 6, 7, 8, 9). Die Kurven, die man durch pH-Einstellung mit verschiedenen Säuren und Veronalpuffern erhält, decken sich nahe zu. In Tabelle 1 sind die von uns gefundenen pH-Optima für die einzelnen Reaktionszeiten zusammengestellt. Die Werte sind den Abbildungen 5, 6, 7, 8 und 9 entnommen.

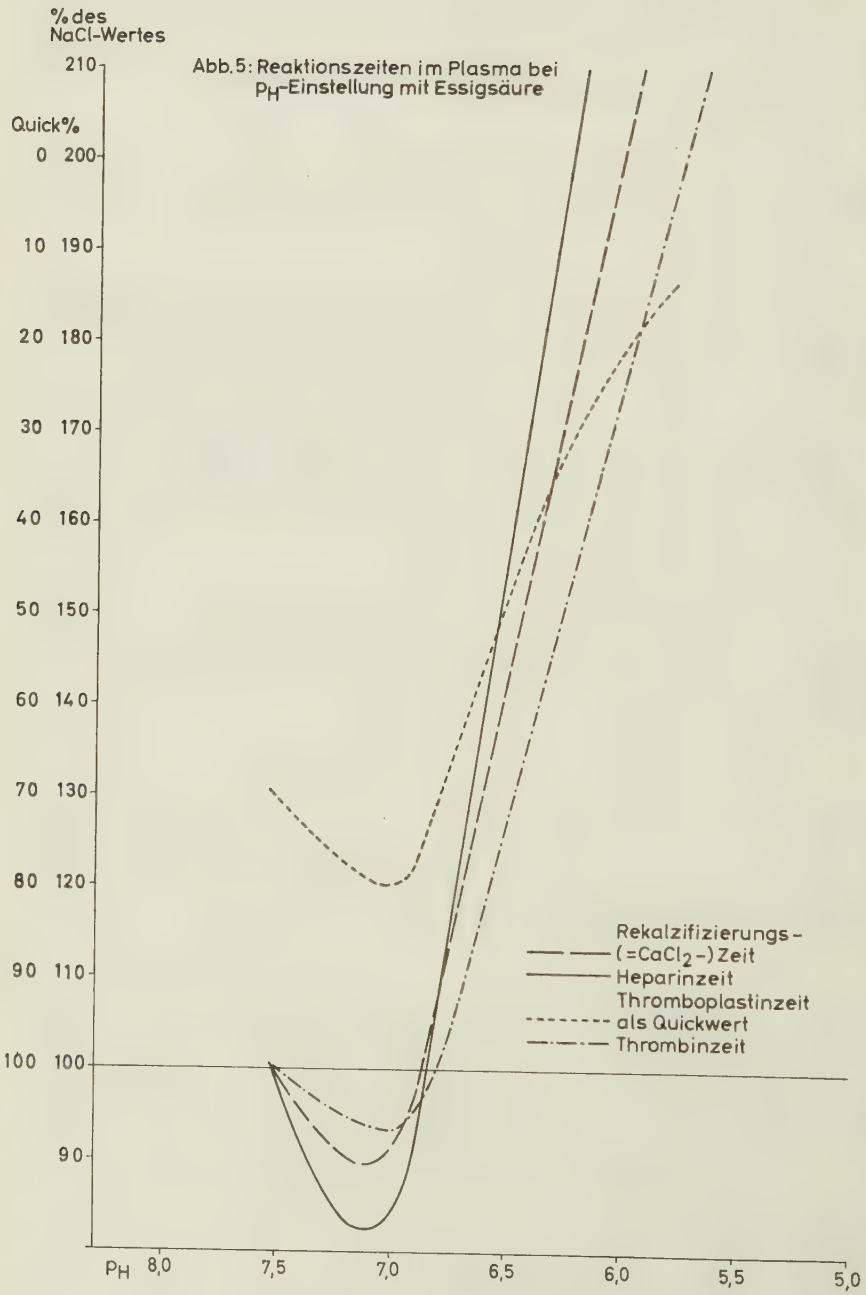
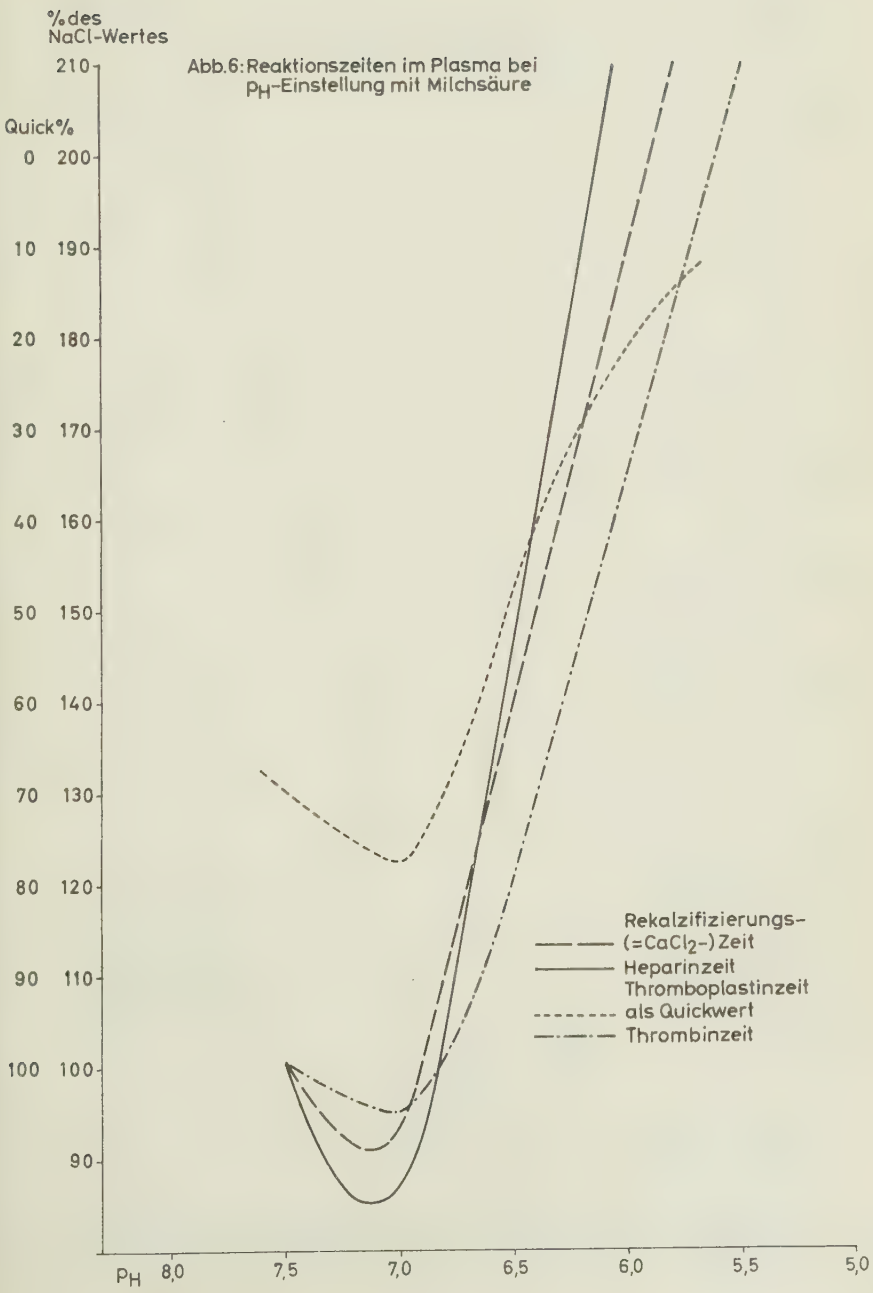
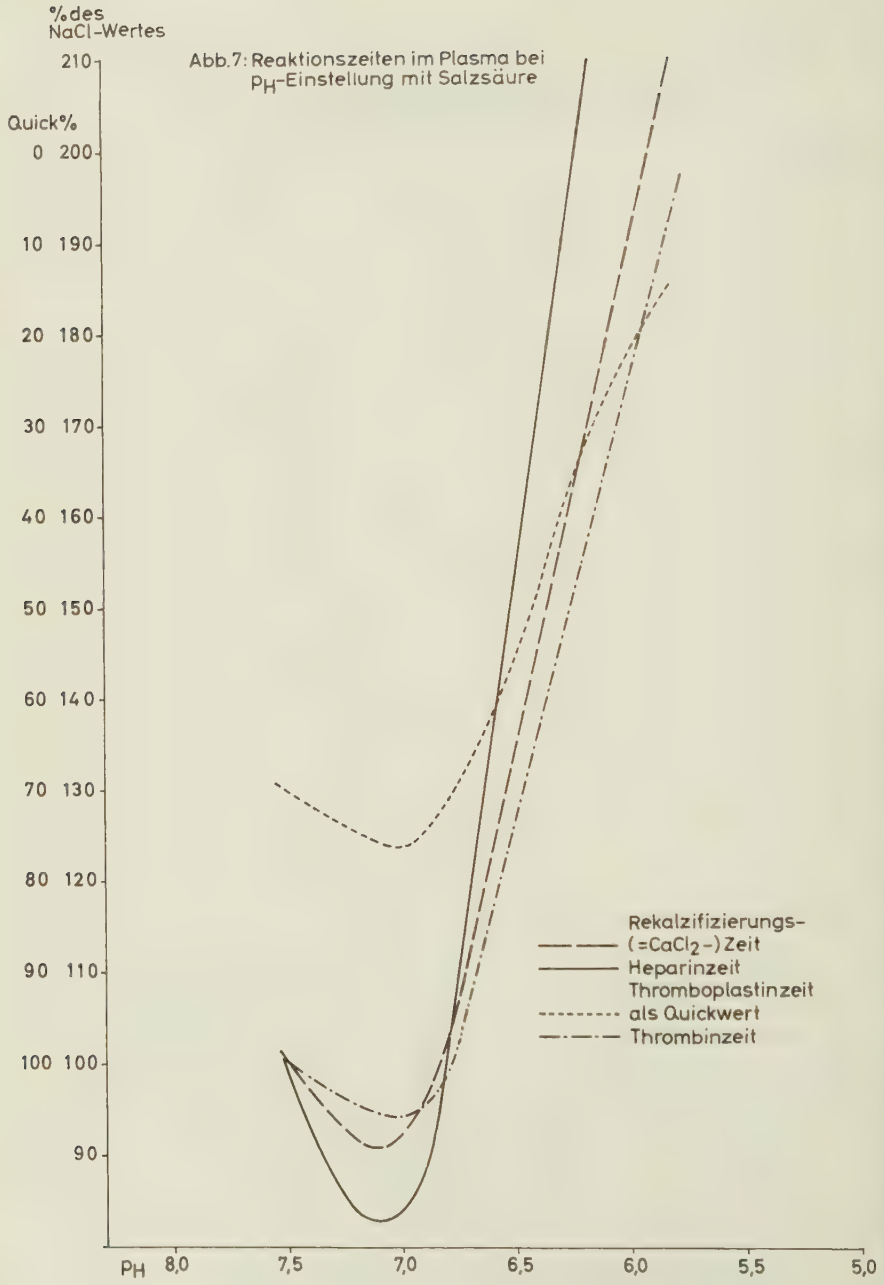
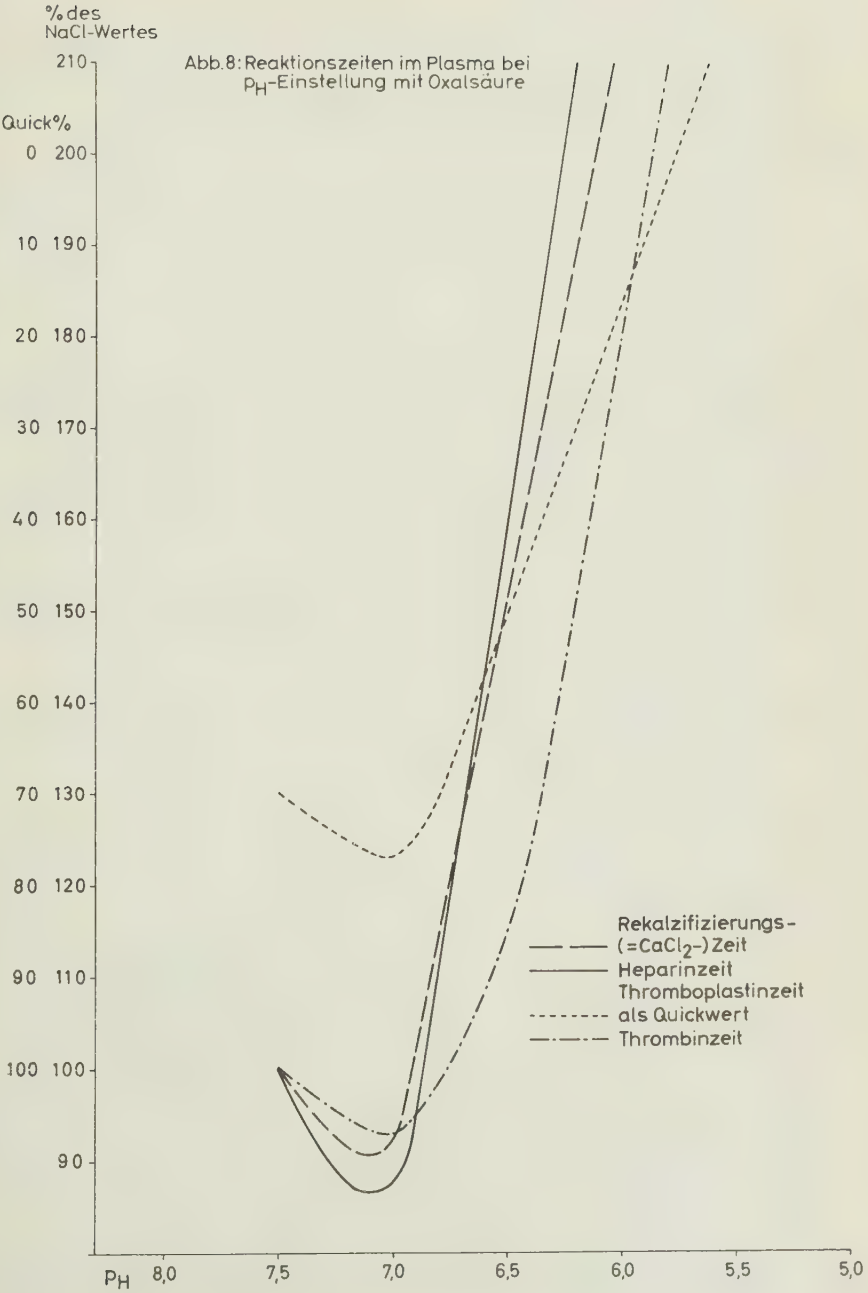


Abb. 5: Reaktionszeiten im Plasma bei p_H-Einstellung mit Essigsäure


%des NaCl-Wertes
Abb.6: Reaktionszeiten im Plasma bei PH-Einstellung mit Milchsäure
Quick%
210
0 200
10 190
20 180
30 170
40 160
50 150
60 140
70 130
80 120
90 110
100 100
90
PH 8,0 7,5 7,0 6,5 6,0 5,5 5,0
Rekalzifizierungs- (=CaCl2-) Zeit
Heparinzeit
Thromboplastinzeit als Quickwert
Thrombinzeit


%des
NaCl-Wertes
Abb.7: Reaktionszeiten im Plasma bei
PH-Einstellung mit Salzsäure
Quick%
210
0 200
10 190
20 180
30 170
40 160
50 150
60 140
70 130
80 120
90 110
100 100
90
PH 8,0
7,5
7,0
6,5
6,0
5,5
5,0
Rekalzifizierungs-
(=CaCl2-)Zeit
Heparinzeit
Thromboplastinzeit
als Quickwert
Thrombinzeit


% des NaCl-Wertes
Abb.8: Reaktionszeiten im Plasma bei P_H-Einstellung mit Oxalsäure
Quick%
210
200
190
180
170
160
150
140
130
120
110
100
90
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
P_H
8,0
7,5
7,0
6,5
6,0
5,5
5,0
Rekalzifizierungs- (=$CaCl_2$-) Zeit
Heparinzeit
Thromboplastinzeit als Quickwert
Thrombinzeit

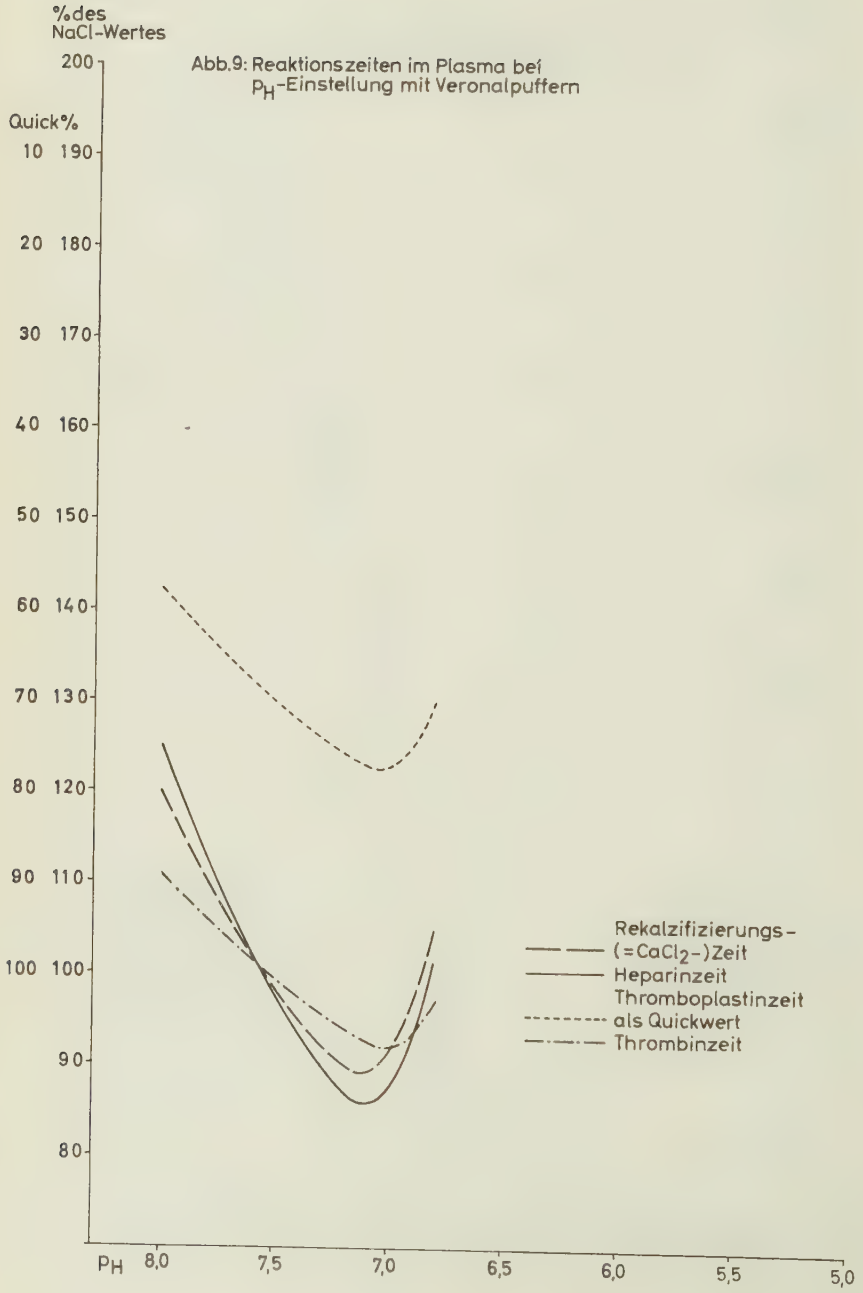


Abb.9: Reaktionszeiten im Plasma bei P_H-Einstellung mit Veronalpuffern

Tabelle 1

pH-Einstellung mit:	Thromboplastinzeit pH-Optimum bei:	Thrombinzeit pH-Optimum bei:	Rekalz.-Zeit pH-Optimum bei:	Heparinzeit pH-Optimum bei:
Essigsäure	pH 7,0	pH 7,0	pH 7,1	pH 7,1
Milchsäure	pH 7,0	pH 7,01	pH 7,1	pH 7,12
Oxalsäure	pH 7,02	pH 7,0	pH 7,1	pH 7,1
Salzsäure	pH 7,0	pH 7,0	pH 7,1	pH 7,1
Veronalpuffer	pH 7,04	pH 7,0	pH 7,11	pH 7,09

Aus der Tabelle ist zu ersehen, daß das pH-Optimum für die Thromboplastinzeit und die Thrombinzeit bei pH 7,0 liegt. Für die Heparinzeit und die Rekalzifizierungszeit liegt das pH-Optimum in etwas alkalischerem Gebiet, bei etwa 7,1. Da für die Reaktionszeiten im System Fibrinogen-Thrombin schon ein pH-Optimum bei pH 7,0 bestimmt wurde, war anzunehmen, daß man das selbe Ergebnis auch im System Plasmafibrinogen - Thrombin erhält.

Die in Tabelle 2 zusammengestellten Werte geben Auskunft darüber, in welchem Ausmaß die einzelnen Gerinnungsbestimmungen vom pH-Wert beeinflußt werden.

Tabelle 2

Reaktionszeiten bei pH 7,5; pH 7,3 und pH-Optimum

pH-Einstellung mit:	Heparinzeit pH 7,5	pH 7,3	pH 7,1	Rekalzifizierungzeit pH 7,5	pH 7,3	pH 7,1
Essigsäure	100 %	87,5 %	83,0 %	100 %	93,0 %	89,5 %
Milchsäure	100 %	89,0 %	85,0 %	100 %	94,0 %	91,0 %
Oxalsäure	100 %	91,0 %	86,5 %	100 %	94,0 %	90,5 %
Salzsäure	100 %	87,5 %	83,0 %	100 %	92,5 %	89,5 %
Veronalpuffer	100 %	90,0 %	86,0 %	100 %	92,5 %	89,5 %

pH-Einstellung mit:	Thrombinzeit pH 7,5	pH 7,3	pH 7,0	Thromboplastinzeit pH 7,5	pH 7,3	pH 7,0
Essigsäure	100 %	97,0 %	93,5 %	70,0 %	75,0 %	80,0 %
Milchsäure	100 %	97,5 %	95,0 %	70,0 %	73,5 %	77,5 %
Oxalsäure	100 %	97,0 %	93,0 %	70,0 %	73,0 %	77,0 %
Salzsäure	100 %	97,0 %	94,0 %	70,0 %	73,0 %	76,0 %
Veronalpuffer	100 %	96,0 %	92,0 %	70,0 %	74,0 %	77,0 %

Die Werte sind den Abbildungen 5, 6, 7, 8 und 9 entnommen. Sie lassen erkennen,

welche Bedeutung das Abweichen vom pH-Optimum für die einzelnen Reaktionszeiten hat.

Erklärung zu Tabelle 2: Die Reaktionszeiten wurden auf den gleichzeitig mitbestimmten Kontrollansatz (S. 19), bezogen und im übrigen die bei pH 7,5 ermittelten Werte = 100 % gesetzt. Die Annäherung an das Optimum entspricht daher einer geringeren Prozentzahl.

Da die Thromboplastinzeiten aus Zweckmäßigkeitsgründen als Quickwerte registriert wurden, entspricht die Annäherung an das Optimum einer Erhöhung der Prozentzahl.

Bei der Bestimmung der Heparinzeit handelt es sich im Prinzip um die Bestimmung der Rekalzifizierungszeit, nach Zugabe einer bestimmten Menge Heparin zu Blut oder Plasma. Der Zusatz von Heparin hat den Zweck, auch kleine Veränderungen im Gerinnungsgeschehen deutlich zu machen, auf dem Wege einer Erschwerung der Gerinnung; oder anders ausgedrückt: jeder Defekt wiegt jetzt schwerer.

Aus Tabelle 2 ist zu entnehmen, daß die Gerinnungsverkürzung zum Gerinnungsoptimum bei pH 7,1 bzw. pH 7,0 bei der Heparinzeit am deutlichsten ist, daß heißt, daß hier schon geringe Änderungen des pH-Wertes in Richtung des pH-Optimums deutliche Verkürzungen der Gerinnungszeit machen. Bei einem pH-Wert von pH 7,3 beträgt die Gerinnungsverkürzung gegenüber dem Ausgangswert von pH 7,5 schon 10 - 12 % (Tabelle 2). Bei Bestimmung der Rekalzifizierungszeit ist die Gerinnungsverkürzung zum Gerinnungsoptimum bei pH 7,1 nicht mehr so deutlich, wie bei der Heparinzeit. Hier ergibt sich zwischen pH 7,5 und pH 7,3 nur noch eine Differenz von ungefähr 6 %.

Noch weniger ausgeprägt ist die Gerinnungsverkürzung zwischen dem Ausgangswert bei pH 7,5 und dem pH-Optimum bei pH 7,0 bei der Thromboplastin- und Thrombinzeit. Die Thromboplastin- und Thrombinzeit erfaßt auch nur noch Teile des gesamten Gerinnungsablaufes.

Verschiebt man die pH-Werte mit Säuren unter pH 6,8 und mit Veronalpuffern über pH 7,5 bis pH 8,0, so kann man aus den entsprechenden Kurven ablesen, daß ungefähr im Bereich von pH 6,7 bis pH 7,5 die "korrigierten Reaktionszeiten" bei der Heparinzeitbestimmung kürzer sind, als die entsprechenden Reaktionszeiten bei Bestimmung der Rekalzifizierungszeit (Abb. 5, 6, 7, 8 und 9). Außerhalb dieses Bereiches verhalten sich die "korrigierten Reaktionszeiten" der beiden Bestimmungen umgekehrt. Das heißt mit anderen Worten, daß sich die Kurven für Heparinzeit und Rekalzifizierungszeit bei pH 6,7 und pH 7,5 schneiden (Abb. 5, 6, 7, 8 und 9), da sowohl im sauren, wie auch im alkalischen Bereich die Reaktionszeiten aller Gerinnungsverlängerungen durch Bestimmung der Heparinzeit deutlicher zum Ausdruck kommen, als bei Bestimmung der Rekalzifizierungszeit.

Die Einführung einer gerinnungshemmenden Substanz, in unserem Fall Heparin, in das Reaktionsgemisch, läßt ein a priori vorhandenes Gerinnungsplus, bzw. Gerinnungsminus, besser hervortreten. Bei Zugabe von gerinnungsbeschleunigenden Faktoren, wie Thrombokinase und Thrombin, wird jedes Gerinnungsplus und jedes Gerinnungsminus weniger deutlich.

MARX und BAYERLE stellten Oxalatplasma mit Essigsäure auf verschiedene pH-Werte ein und bestimmten die Rekalzifizierungszeiten. Sie fanden unterhalb pH 7,0 deutlich verlängerte Werte. Ein pH-Optimum der Oxalatplasma - Rekalzifizierungszeiten ist von ihnen nicht bestimmt worden.

Bei unseren Bestimmungen erhielten wir zunächst eine Verkürzung der Reaktionszeiten gegenüber dem Ausgangswert von pH 7,5 (100%). Nach Überschreiten des pH-Optimums bei pH 7,0 bzw. pH 7,1 nahmen die Reaktionszeiten wieder zu und erreichten ungefähr bei pH 6,8 wieder die Zeiten des Ausgangswertes bei pH 7,5 (Abb. 5, 6, 7, 8 und 9). Verschiebt man die pH-Werte immer weiter in den sauren Bereich, so findet schließlich keine Gerinnung mehr statt. Bei der Heparinzeit geschieht dies ab pH 5,5; bei der Rekalzifizierungszeit etwa ab pH 5,2 und bei der Thromboplastinzeit und der Thrombinzeit etwa ab pH 5,0.

Die Bestimmung der Heparinzeit ist also gegenüber pH-Verschiebungen in stärker sauren Bereich somit am empfindlichsten, da keine Überdeckung durch gerinnungsfördernde Faktoren stattfinden kann.

4.) Thrombelastographische Meßwerte

Bei der Bestimmung der Rekalzifizierungszeit wurde m/40 $CaCl_2$-Lösung im Verhältnis 1 : 1 zum Gerinnungssubstrat gegeben.

Die zugegebene $CaCl_2$-Menge war bei den thrombelastographischen Untersuchungen hingegen viel geringer: 0,3 ml Gerinnungssubstrat wurden durch 0,06 ml isotonische $CaCl_2$-Lösung zur Gerinnung gebracht.

Dieser Unterschied machte sich bei den Ergebnissen der pH-Einstellung mit Oxalsäure bemerkbar. Im Bereich unter pH 6,7 wurden die thrombelastographischen Ergebnisse durch die Bildung von Ca-Oxalat stark beeinflußt, während bei der Bestimmung der Rekalzifizierungszeit die Ca-Oxalat-Bildung kaum ins Gewicht fiel, da $CaCl_2$ im Überschuss vorhanden war.

Auch bei den thrombelastographischen Untersuchungen wurde das Plasma 1 : 1 mit 0,9%iger NaCl-Lösung oder Säurelösung gemischt. Das Ausgangssubstrat bestand aus 0,15 ml Plasma + 0,15 ml 0,9%iger NaCl-Lösung und hatte einen pH-Wert von 7,4.

Die Einstellung der pH-Werte erfolgte wieder mit den vier genannten Säuren (S. 5)

und mit Veronalpuffern (S. 5). Die Messung der pH-Werte erfolgte sofort anschließend an die Füllung der Küvetten im Thrombelastographen.

Für jeden Wert wurden drei Bestimmungen mit dem Thrombelastographen ausgeführt, der Mittelwert genommen und zusammen mit den Mittelwerten der pH-Messung, die auch jeweils dreimal ausgeführt wurde, in ein Koordinatensystem eingetragen (Abb. 10, 11, 12, 13, 14).

In Tabelle 3 sind die pH-Optima für die Reaktionszeit r, die Gerinnselbildungszeit k und die Thrombuselastizität ε nach 1/2, 1 und 2 Stunden zusammengestellt. Die Werte wurden den Abbildungen 10, 11, 12, 13 und 14 entnommen.

Tabelle 3

pH-Einstellung mit:	Reaktionszeit r pH-Optimum	Gerinnselbildungsz. k pH-Optimum	Thrombuselastizität ε n. 30' pH-Opt.	n. 60' pH-Opt.	n. 120' pH-Opt.
Essigsäure	pH 7,08	pH 7,09	pH 7,08	pH 6,91	pH 6,76
Milchsäure	pH 7,10	pH 7,08	pH 7,10	pH 7,00	pH 6,86
Oxalsäure	pH 7,10	pH 7,10	pH 7,10	pH 6,98	pH 6,70
Salzsäure	pH 7,08	pH 7,07	pH 7,10	pH 7,02	pH 6,92
Veronalpuffer	pH 7,10	pH 7,10	pH 7,14	pH 7,10	pH 6,90

Aus der Tabelle 3 ist ersichtlich, daß man bei den Messungen mit dem Thrombelastographen für die Reaktionszeit r etwa dasselbe pH-Optimum von pH 7,1 erhält, wie bei den Bestimmungen der Rekalzifizierungs- und Heparinzeit. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da es sich bei der Reaktionszeit r um eine Art Rekalzifizierungszeit handelt. Mit den allgemein üblichen Verfahren zur Bestimmung der Blutgerinnung kann allerdings nur der Gerinnungseintritt erfaßt werden; eine Beurteilung der Funktionstüchtigkeit des entstandenen Gerinnsels ist nicht möglich.

An Hand unserer thrombelastographischen Untersuchungen konnten wir feststellen, daß das pH-Optimum von pH 7,1 nicht nur für die Reaktionszeit r, sondern auch für die Gerinnselbildungszeit k und die Thrombuselastizität ε nach 1/2 Stunde gilt.

Das bedeutet, daß Blutgerinnung und Geschwindigkeit der Gerinnselbildung denselben optimalen pH-Wert von pH 7,1 haben.

Verschiebt man mit Veronalpuffern die pH-Werte des Gerinnungssubstrates bis pH 7,6 und mit Säuren unter pH 7,0, so kann man aus den einzelnen Kurven ablesen, daß im Bereich von pH 7,55 bis pH 6,50 die Gerinnselbildungszeit k kürzer ist, als die entsprechende Reaktionszeit r. Dies entspricht den von HARTERT

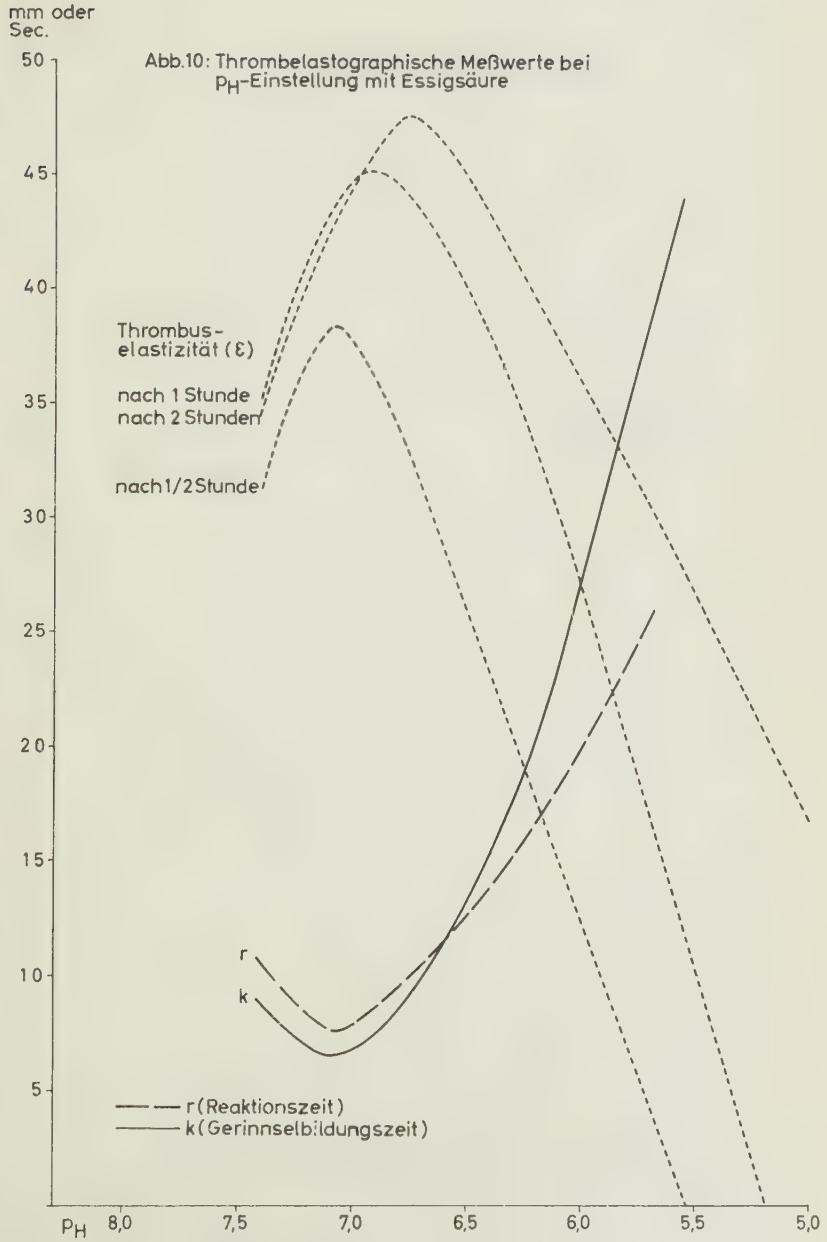
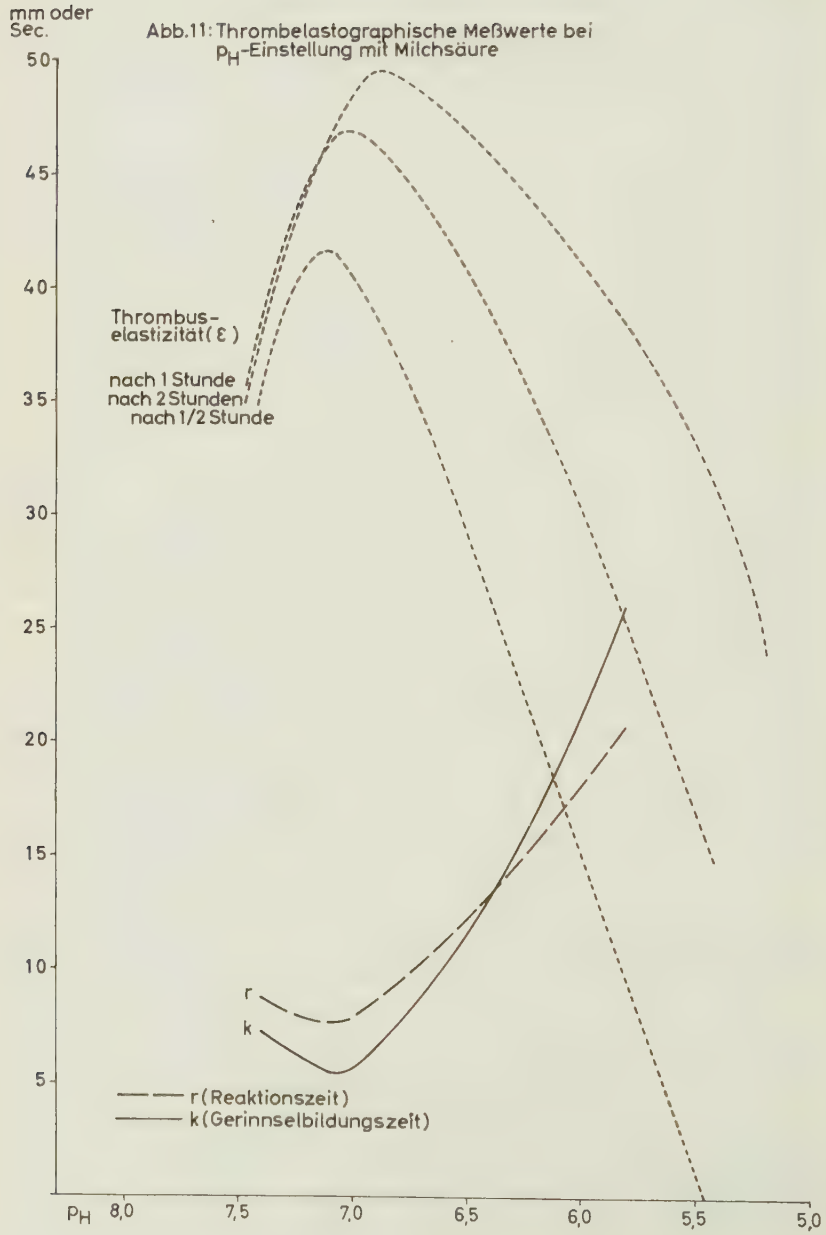
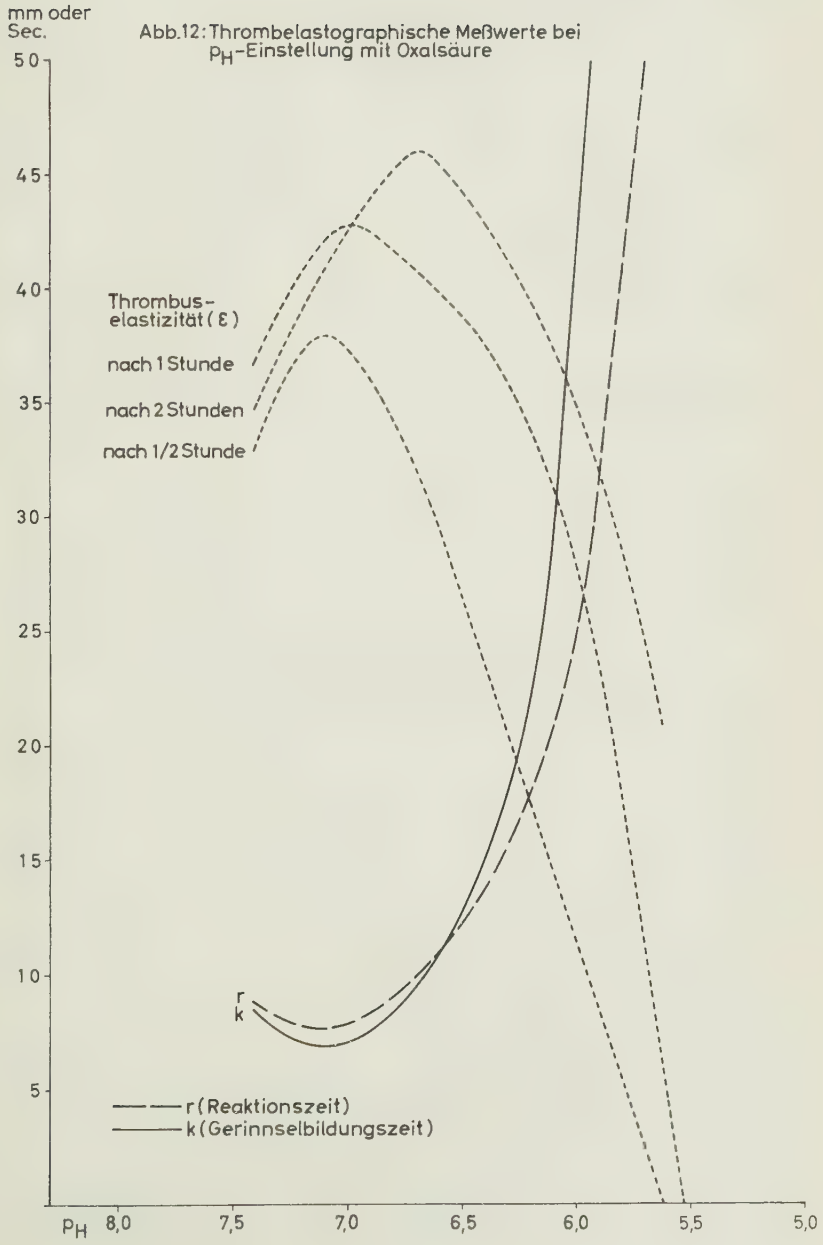


Abb.10: Thrombelastographische Meßwerte bei p_H-Einstellung mit Essigsäure


mm oder Sec.
Abb.11: Thrombelastographische Meßwerte bei P_H-Einstellung mit Milchsäure
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
Thrombus-elastizität (ε)
nach 1 Stunde
nach 2 Stunden
nach 1/2 Stunde
r
k
r (Reaktionszeit)
k (Gerinnselbildungszeit)
P_H 8,0 7,5 7,0 6,5 6,0 5,5 5,0


mm oder Sec.
Abb.12: Thrombelastographische Meßwerte bei p_H-Einstellung mit Oxalsäure
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
Thrombus-elastizität (ε)
nach 1 Stunde
nach 2 Stunden
nach 1/2 Stunde
r
k
r (Reaktionszeit)
k (Gerinnselbildungszeit)
p_H 8,0 7,5 7,0 6,5 6,0 5,5 5,0

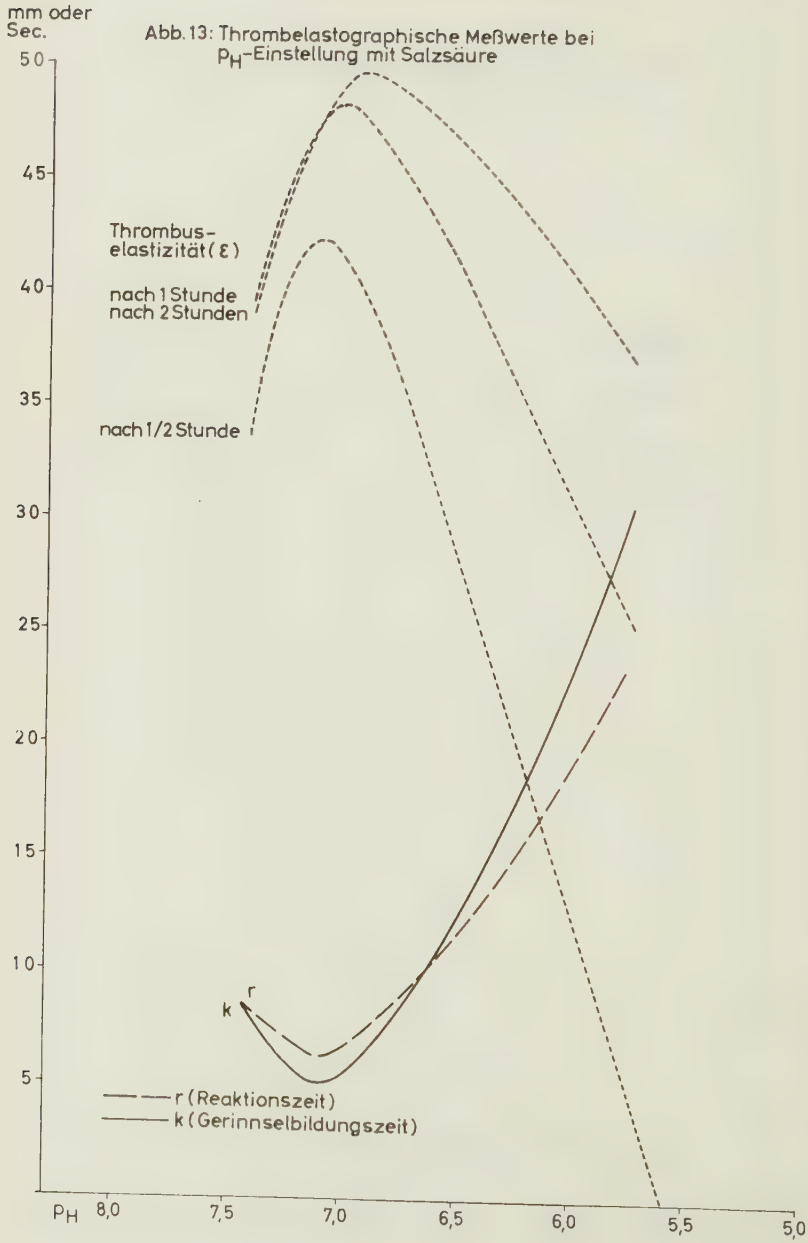

mm oder Sec.
Abb. 13: Thrombelastographische Meßwerte bei P_H-Einstellung mit Salzsäure
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
Thrombus-elastizität (ℰ)
nach 1 Stunde
nach 2 Stunden
nach 1/2 Stunde
r
k
r (Reaktionszeit)
k (Gerinnselbildungszeit)
P_H 8,0 7,5 7,0 6,5 6,0 5,5 5,0

Abb. 14: Thrombelastographische Meßwerte bei p_H-Einstellung mit Veronalpuffern (p_H 6,8 – 7,6)

angegebenen Normalwerten für Zitratplasma.

Außerhalb dieses Bereiches verhalten sich die Werte für r und k umgekehrt.

Hieraus folgt, daß der Gerinnselaufbau in stärker saurem oder alkalischem Milieu mehr gestört ist, als die Gerinnung allein.

Werden die pH-Werte weiter in den sauren Bereich verschoben, so tritt schließlich keine Gerinnung mehr ein. Für die Reaktionszeit r ist dies im Durchschnitt ab pH 5,0 der Fall, bei Einstellung der pH-Werte mit Oxalsäure aus den oben genannten Gründen schon ab pH 5,5.

Die der Gerinnselbildungszeit k entsprechende Kurvenbreite von 20 mm wird schon ab pH 5,3 nicht mehr erreicht. Bei Oxalsäure ab pH 5,8.

Aus den Abbildungen 10, 11, 12, 13, 14 und der Tabelle 3 kann man ablesen, daß sich das Maximum der Thrombuselastizität nach einer und noch mehr nach zwei Stunden in den sauren Bereich verschiebt. Es liegt im Durchschnitt nach einer Stunde bei pH 7,0; nach zwei Stunden bei pH 6,8.

Während im Bereich über pH 7,1 nach zwei Stunden schon eine deutliche Thrombuserschlaffung eingetreten ist, der maximale Thrombuselastizitätswert m_ε also schon vorher erreicht wurde, ist dies im weiter sauren Bereich nicht der Fall. Hier nimmt die Thrombuselastizität nach zwei Stunden noch laufend zu, um erst später, die Zeit ist vom pH-Wert abhängig, ein Maximum zu erreichen. Bei Einstellung von pH-Werten unter pH 7,4 nimmt der Wert für die maximale Thrombuselastizität m_E gegenüber dem des Ausgangswertes von pH 7,4 laufend zu und erreicht schließlich nach drei bis vier Stunden ungefähr bei pH 6,5 ein Maximum. Die Werte für r und k sind in diesem Bereich aber schon deutlich verlängert, d.h., daß sowohl Gerinnung, als auch Thrombusbildung deutlich langsamer erfolgen, als in weiter alkalischem Gebiet.

Im Bereich über pH 7,4 (Einstellung mit Veronalpuffern) nimmt die maximale Thrombuselastizität m_ε ab, die Werte für r und k sind verlängert.

Nach HAWN, VAN ZANDT und PORTER zeigt ein bei saurer Reaktion geronnenes Fibrinogen im Elektronenmikroskop eine stärkere Grobballigkeit, als ein bei alkalischer Reaktion geronnenes Fibrinogen. Das erstere erwies sich auch als mechanisch deutlich fester. Die Fibrinmolekülstruktur scheint von diesen Veränderungen nicht betroffen zu sein, da die Querstreifungsperiode im Elektronenmikroskop bei allen Versuchen gleich blieb.

MEUNIER und LANDON bestimmten mit dem Elektrophotometer die durch die Plasmagerinnung verursachte Trübungsänderung. Die Verfasser führten ihre Messungen im Bereich von pH 8,0 bis pH 6,8 aus und erhielten eine fortschreitende

Zunahme der Trübung. Sie glauben, daß die ursprüngliche Alkalität des Plasmas die Wirkung hat, eine Flockung zu verhindern. Im Gegensatz dazu soll die Säuerung den Gleichgewichtszustand der Mizellen ändern und ihre Vereinigung zu größeren Komplexen begünstigen. Diese Anschauung deckt sich mit den oben angeführten elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Es kann sein, daß dieser Mechanismus hier eine Rolle spielt; aber es muß besonders betont werden, daß im weiter sauren Bereich r und k deutlich verlängert sind und die bei pH 6,5 gefundene maximale Thrombuselastizität m_E erst nach einigen Stunden erreicht wird.

III. DISKUSSION

Nach den vorliegenden Untersuchungen fällt das pH-Optimum der Blutgerinnung nicht mit dem durchschnittlichen Blut-pH-Wert des Menschen von pH 7,4 zusammen.

Mit den Methoden, die den gesamten Gerinnungsablauf erfassen, Rekalzifizierungszeit, Heparinzeit und Thrombelastogramm erhielten wir ein pH - Optimum von pH 7,1. Bei Bestimmung der Prothrombinzeit und der Thrombinzeit ergab sich dagegen ein pH-Optimum bei pH 7,0. Letztere Bestimmung wurde mit reinem Fibrinogen und in Plasma ausgeführt.

Unsere Ergebnisse über das pH-Optimum bei der Umwandlung eines reinen Fibrinogen durch Thrombin - dadurch wird die Wirkung anderer Faktoren ausgeschaltet - stimmen mit den Ergebnissen von ASTRUP überein. Er verwendete für seine Untersuchungen Bordet-Plasma vom Rind (Oxalatplasma, bei dem das Prothrombin durch Adsorption an Trikalziumphosphat nach Bordet entfernt worden ist). Die Einstellung verschiedener pH-Werte erfolgte bei ASTRUP mit HCl. Er fand ein Wirkungsoptimum für Thrombin bei pH 7,0.

Bei Zugabe von 1/1 molarer Phosphatpuffer nach Sörensen erhielt ASTRUP ein Optimum der Thrombinwirkung bei pH 6,2 bis pH 6,5.

Wir stellten die Ph-Werte der Fibrinogenlösung mit 1/15 molaren Phosphatpuffern ein und erhielten das gleiche pH-Optimum der Thrombinwirkung, wie bei pH-Einstellung mit Säuren.

Es ist bekannt, daß Neutralsalze die Blutgerinnung hemmen. Die genaue Untersuchung dieses Phänomens stammt von WÖHLISCH.

Die Proteine werden als Elektrolyte von der Ionenstärke der verwendeten Salze beeinflußt. Die Enzymproteine, um solche handelt es sich bei den Blutgerinnungsfaktoren, unterliegen diesem Gesetz.

Die Ionenstärke eines Phosphatpuffers z.B. ist abhängig vom Mischungsverhältnis des primären und sekundären Phosphats. Dies wird durch den pH-Wert bestimmt. Deshalb sind die Ergebnisse, die man durch Einstellung mit Phosphatpuffern erhält durch die Änderung der Ionenstärke und des pH-Wertes entstanden.

Bei Verwendung 1/15 molarer Phosphatpuffer, wie in unserem Fall, ist aber die Ionenstärke so gering, daß Unterschiede in der Ionenstärke, die bei den einzelnen pH-Einstellungen auftreten, vernachläßigt werden können. Das gilt nicht für 1/1 molare Puffer, wie sie ASTRUP verwendet hat. Bei Zugabe von 0,6 molarer NaCl-Lösung zu einer Plasma-HCl-Lösung fand ASTRUP insgesamt eine Verlängerung der Reaktionszeiten, aber keine Veränderung des pH-Optimums.

Bei der Nachprüfung dieses Ergebnisses verwendeten wir eine fortlaufende Verdünnungsreihe von Essigsäure in 0,6 molarer NaCl-Lösung, anstelle von 0,9%iger NaCl-Lösung (Abb. 4). Es fand sich ebenfalls keine Veränderung des pH-Optimums; aber während bei der Verdünnung mit 0,9%iger NaCl-Lösung (0,143 molar) Ungerinnbarkeit des Fibrinogens bei ungefähr pH 5,0 eintrat, geschah dies bei Verdünnung mit 0,6 molarer NaCl-Lösung schon etwa ab pH 6,5. Auch bei der pH-Einstellung mit Säuren kann man ein pH-Optimum der Thrombinwirkung bei pH 6,0 - pH 6,5 erhalten, wenn gleichzeitig der NaCl-Gehalt und damit die Ionenstärke in passender Weise variiert wird.

Es ist deshalb bei biochemischen Untersuchungen von großer Bedeutung, Puffermischungen von konstanter Ionenstärke zu verwenden. Eine solche Puffermischung ist der von uns verwendete Veronalpuffer im Bereich vom pH 8,0 - pH 6,8.

Die Verwendung von Phosphatpuffern bei unseren Bestimmungen war schon deshalb ungeeignet, weil dadurch mit Kalzium Ca-Phosphat ausfällt.

Der Einfluß der Ionenstärke auf Enzymsysteme darf nicht mit der spezifischen Wirkung einzelner Ionen verwechselt werden, sondern hat allgemeinen Charakter, ebenso wie der Einfluß des pH-Wertes.

Mit der Thromboplastinzeit wird hauptsächlich die Geschwindigkeit der Thrombinbildung erfaßt. Diese ist abhängig vom Gehalt des Blutes an Prothrombin und der an der Thromboplastinbildung beteiligten Faktoren.

> MARX und BAYERLE erhielten mit gereinigtem Prothrombin nach SEEGERS, SMITH und BRINKHOUS eine Abhängigkeit der Prothrombinumwandlung durch Thrombokinase und Kalzium von pH-Wert, mit einem Optimum bei pH 7,0.
>
> Nachdem das pH-Optimum sowohl für die Thrombinwirkung, als auch für die Thrombinentstehung bei pH 7,0 gefunden wurde, war dasselbe Ergebnis für die Thromboplastinzeit zu erwarten.

Mit der Heparinzeit und der Rekalzifizierungszeit werden, im Gegensatz zur Thromboplastin- und Thrombinzeit, alle Phasen der Blutgerinnung erfaßt, auch gerinnungsphysiologische Veränderungen in der Vorphase und der 1. Phase der Gerinnung.

Diese unterschiedliche Reichweite der einzelnen Gerinnungsbestimmungen könnte ein Grund dafür sein, daß das pH-Optimum für Rekalzifizierungszeit und Heparinzeit in etwas alkalischerem Gebiet liegt, bei pH 7,1, gegenüber dem pH-Optimum von pH 7,0 für Thromboplastin- und Thrombinzeit.

BIGELOW erhielt mit Oxalatplasma bei pH-Einstellung mit NaOH und HCl ebenfalls kürzeste Thrombinzeiten bei pH 7,0. Seine Rekalzifizierungszeiten waren im

Bereich von pH 7,2 - pH 7,5 am kürzesten. Dies entspricht etwa unseren Ergebnissen, nur konnten wir auch für die Rekalzifizierungszeit ein exakteres Optimum bestimmen. Für die Prothrombinzeit erhielt der Verfasser ein von unseren Ergebnissen abweichendes Optimum bei pH 7,35.

Das pH-Optimum der Gesamtgerinnung ist durch eine viel größere Summe der pH-Optima einzelner Enzymproteine entstanden. Wahrscheinlich spielt auch die Lage der isoelektrischen Punkte der einzelnen Enzymproteine eine Rolle.

Nachdem das Gerinnungsoptimum für menschliches Blut bei pH 7,1 festgestellt wurde, muß man sich fragen, ob eine Acidose, wie sie in vivo bei verschiedenen Zuständen beobachtet wird, eine Aktivierung der Blutgerinnung und damit der Thromboseentstehung bedeutet.

Eine Acidose kann bedingt sein:

1.) durch metabolische Störungen,
2.) durch respiratorische Störungen.

So hat z.B. MAURATH mit BARK festgestellt, daß bei Narkose unter Spontanatmung mit O_2 bei Intubation das Atemminutenvolumen abnahm, CO_2-Gehalt- und -Spannung stark angestiegen waren und der Blut-pH-Wert auf pH 7,21 - pH 7,25 abgesunken war.

Möller fand bei pH-Bestimmungen im Blut nach Transfusion anfänglich eine Neigung zur Verschiebung nach der sauren Seite.

POTH, CUNNINGHAM und MEYER haben bei der Anwendung des extrakorporalen Kreislaufes eine metabolische Acidose gefunden, besonders durch Anstieg des Milchsäurespiegels, wahrscheinlich als Folge eines O_2-Mangels im Gewebe, bei zu geringer Durchblutung.

Allgemein bekannt ist die diabetische Acidose, die besonders durch Narkose noch gesteigert werden kann.

Auch durch hämorrhagischen Schock und Anoxie kommt es zum Anstieg des Milchsäurespiegels und damit zur Acidose.

Nach VIRCHOW kommen für die Thromboseentstehung folgende Ursachen, Virchow'sche Trias, in Frage:

1.) Verlangsamung der Strömungsgeschwindigkeit,
2.) Gefäßwandschädigung,
3.) Veränderungen in der Zusammensetzung und chemisch - physikalischen Beschaffenheit des Blutes, besonders eine Erhöhung der Gerinnungstendenz.

Durch die Verlangsamung der Strömungsgeschwindigkeit des Blutes kommt es zur mangelnden O_2-Versorgung des Gewebes, damit zur Anreicherung von CO_2 und

Milchsäure im Blut und zur Acidose. Dadurch wird die chemisch - physikalische Beschaffenheit des Blutes so verändert, daß eine erhöhte Gerinnungstendenz resultiert.

Nach BASSI gerinnt dunkelrotes, O_2-armes Blut, wie es z.B. in Varizen vorkommt, schnell. Auch ein Absinken des O_2-Gehaltes im Venenblut soll die Gerinnungsbereitschaft steigern.

PALOS fand nach CO_2-Atmung bei Kaninchen ein "Verminderung der Thrombininaktivierung" und damit eine Zunahme der Gerinnbarkeit des Blutes.

Bei Kranken mit einer Cyanose fand PALOS eine beinahe mit dem Grad der Cyanose parallel laufende Abnahme der Thrombininaktivierung (PALOS 1948).

Die Steigerung der Oxydationsprozesse in vivo oder in vitro, wie z.B. bei einer Hyperthyreose, O_2-Atmung oder O_2-Durchströmung, verlängern die Gerinnungszeit des Blutes. Diese Zustände gehen aber mit einer deutlichen Alkalose des Blutes einher.

So fand PALOS bei Durchströmen des Blutes mit O_2 eine Verschiebung des Blut-pH-Wertes von pH 7,36 bis pH 8,00. Wurde der pH-Wert des Blutes wieder auf den Ausgangswert zurückgeführt, erreichte auch die Gerinnbarkeit des Blutes fast wieder den Ausgangswert (PALOS 1949).

Auch wir konnten durch Verschieben der Blut-pH-Werte bis pH 8,0 mit Veronalpuffern eine deutliche Verlängerung der Reaktionszeiten gegenüber dem Ausgangswert feststellen. Bei den thrombelastographischen Bestimmungen zeigte sich außerdem eine Verlängerung der Gerinnselbildungszeit k und eine geringere Elastizität des entstandenen Gerinnsels.

Durch eine Herabsetzung der Oxydationsprozesse, wie z.B. bei Hypothyreose, Inhalationsnarkose, kardiale Dekompensation, CO_2-Atmung, bzw. - Durchströmung fand PALOS eine Verkürzung der Gerinnungszeit des Blutes (PALOS 1949).

Arterielles Blut gerinnt langsamer als venöses. In Gefäßgebieten mit verlangsamter Blutströmung, z.B. in varikösen Erweiterungen, entstehen leicht Thromben.

Es hat sich aber gezeigt, daß bei Krankheiten, die mit einer Acidose des Blutes und einer erhöhten Thromboseneigung einhergehen, auch andere Faktoren eine Rolle spielen.

Eine Vermehrung des Fibrinogens fand sich bei Hypertonie, Arteriosklerose, Endangitis, Diabetes (GIANNICO) und bei dekompensierten Vitien (KELLER, SPANG und HARTERT). Eine erhöhte Heparintoleranz, bzw. eine verkürzte Gerinnungszeit wurde bei Hypertonie (SCHNIEDER), Arteriosklerose, Endangitis

(MARMONT und PALMIERI) gefunden.

Alle diese Zustände sind durch eine gewisse Thromboseneigung ausgezeichnet. Es kann gesagt werden, daß vor dem Zustandekommen von Thrombosen eine Hyperkoagubilität besteht, die häufiger durch geringfügige Veränderungen mehrerer Faktoren als durch massive Veränderung eines Faktors bedingt ist.

Um die Einwirkung anderer Faktoren auf die Blutgerinnung auszuschließen, schien es wünschenswert, den Einfluß des pH-Wertes auf die Blutgerinnung in vitro exakt zu bestimmen.

Für die Routinebestimmungen auch in kleineren Gerinnungslabors wäre zu fordern, daß vor allem die Ermittlung der Rekalzifizierungszeit und Heparinzeit bei dem für diese Reaktionszeiten ermittelten Gerinnungsoptimum erfolgt. Die sehr störenden Differenzen der gemessenen Zeiten, die nicht nur Doppel-, sondern häufig 3-fach-Bestimmungen erfordern, liessen sich dadurch wohl verringern.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

Es wird über den Einfluß des pH-Wertes auf die Blutgerinnung berichtet. Die Bestimmungen wurden im Plasma und im künstlichen Gerinnungssystem ausgeführt. Die Einstellung verschiedener pH-Werte erfolgte mit Säuren und Veronalpuffern.

Es wurde die Thrombinzeit, die Prothrombinzeit, die Rekalzifizierungszeit und die Heparinzeit bestimmt; außerdem wurden vergleichende Bestimmungen mit dem Thrombelastographen nach HARTERT ausgeführt. Die Ergebnisse der einzelnen Bestimmungsmethoden wurden miteinander verglichen.

Es besteht ein deutlicher Zusammenhang zwischen Blutgerinnung und Blut-pH-Wert, wobei der für die Blutgerinnung optimale pH-Wert bei pH 7,10 liegt und somit nicht mit dem physiologischen Blut-pH-Wert von pH 7,36 zusammenfällt.

Es wird auf mögliche Zusammenhänge zwischen einer Acidose des Blutes in vivo und Thromboseneigung hingewiesen.

Hinweis auf die Bedeutung einer optimalen pH-Einstellung für die Ermittlung vor allem der Rekalzifizierungs- und Heparinzeit.

V. LITERATURVERZEICHNIS

Astrup, T.; Biochem. Z. 313 : 229 (1942)

Bartels, H.; Bücherl, E.; Hertz, C.W.; Rodewald, G.; Schwab, M.: Lungenfunktionsprüfungen, S.: 294 (1959)
Springer Verlag.

Bassi, Gl.; Angéilogie, N. S. 9 (3) : 11 - 15 (1957)
Ref. in Z.O. der Chirurgie 152 : 179 (1957)

Baumberger, J. P.; Ber. Physiol. 37 : 839 (1926)

Baumberger, J. P.; Ber. Physiol. 38 : 551 (1926)

Bigelow, F. S.; J. Clin. Invest. 30 : 629 (1951)

Bürker, K.; Pflügers Archiv Physiol. 102 : 55 (1904)

Chio, M.; Zbl. Biochem. 19 : 1440 (1917)

Crut, G.; Ber. Physiol. 115 : 575 (1939)

Deetjen, J.; Zbl. Physiol. Chem. 63 : 1 (1909)

Eagle, H.; J. Exper. Med. 65 : 613 (1937)

Ellerbrook, P.; Ramsden, J., Rees, C. und Brown, J. F.;
Amer. J. Clin. Path. 32 : 218 (1959)

Giannico, O.; Policlinico 35 : 1271 (1948)

Hartert, H.; Klin. Wschr. 26 : 577 (1948)

Hartert, H.; Klin. Wschr. 27 : 789 (1949)

Hartert, H.; Dtsch. Archiv Klin. Med. 199 : 284 (1952)

Hawn, O. C.;van Zandt, C. und Porter, K. R.; J. Exper. Med.
86 : 285 (1947)

Herzfeld, E. und Klinger, K.; Biochem. Z. 71 : 391 (1915)

Keller, V.; Spang, K. und Hartert, H.; Dtsch. Archiv Klin. Med.
199 : 169 (1952)

Koller, F. und Frick, P.; Helv. Chim. Acta 32 : 717 (1949)

Kugelmaß, I. N.; Archiv Int. Physiol. 21 : 139 (1923)

Kuwashima, K.; J. of Biochem. 3 : 91 (1933)

Marbert, R. und Winterstein, A.: Ärztl. Forschung 10 (1) : 460 (1955)

Marmont, M. und Palmieri, Q.; Rec. Progr. Med. 11 : 145 (1951)

Marx, R. und Bayerle, H.: Pflügers Archiv Physiol. 250 : 714 (1948/49)

Matis, P.; Meyer, W. und Mörl, F.: Zbl. Chirurgie 83 : 599 (1957)

Maurath, J.: Patho-Physiologie der Atmung in der Lungenchirurgie 1955 S.: 30

Meunier, P. und Landon, A.: C. R. Hebdomadaires des Séances 143 : 1044 (1949)

Möller, H.: 5. Kongreß der Europ. Ges. f. Hämatologie in Freiburg 1956 S.: 281

Palos, L. A.: Schweiz. Med. Wschr. 78 : 112 (1948)

Palos, L. A.: Nature 164 : 926 (1949)

Poth, E. J.; Cunningham, P. und Meyer, J. V.: Americ. Surgeon 23 : 1056 (1957)

Schmidt, A.: Zur Blutlehre, Leipzig 1892

Schnieder, R. A.: J. Clin. Invest. 30 : 672 (1951)

Schulz, F.: Inaugural Dissertation Berlin 1922

Seegers, W. H.; Smith, H. P. und Brinkhous, H.; J. Biol. Chem. 123 : 751 (1938)

Seegers, W. H. und Smith, H. P.: Americ. J. Physiol. 137 : 348 (1942)

Sigg, B.: Schweiz. Med. Wschr. 82 : 284 (1952)

Sigg, B.: Klin. Wschr. 30 : 205 (1952)

Soulier, J. P.; Ann. Biol. Clin. 10 : 82 (1952)

Stuber, B. und Lang, K.: Biochem. Z. 191 : 378 (1927)

Waugh, T. R. und Ruddick, D. W.: Canad. Med. Ass. 5 : 547 (1944)

Widenbauer, F.: Dtsch. Med. Wschr. 68 (2) : 1243 (1942)

Widenbauer, F. und Reichel, P.: Klin. Wschr. 21 : 436 (1942)

Widenbauer, F. und Reichel, P.: Klin. Wschr. 21 : 524 (1942)

Wöhlisch, E.: Klin. Wschr. 2 (2) : 1801 (1923)

Wöhlisch E.: Biochem. Z. 316 : 295 (1942)

De Takats, G.: J. Amer. Med. Ass. 146 : 1370 (1943)

Tsunoo, S.: Pflügers Archiv Physiol. 205 : 255 (1924)

Herrn Prof. Dr. Dick bin ich für die Überlassung des Themas und die mir an seiner Klinik gegebenen Arbeitsmöglichkeiten zu größtem Dank verpflichtet.

Herrn Dr. med. W. Mayer danke ich für die methodische Einführung, Herrn Doz. Dr. Matis für zahlreiche Anregungen im Verlaufe der Untersuchungen und Diskussion der Arbeit.

LEBENSLAUF

Am 22. Mai 1936 wurde ich, Christine Knoll, als Tochter des Dipl.-Ing. Erich Knoll und seiner Ehefrau Ruth, geb. Ellwanger, in Leipzig geboren.

Nach Besuch der Volksschule in Leipzig und Pfalzgrafenweiler/ Schwarzwald, trat ich im September 1946 in das Kepler Gymnasium in Freudenstadt ein, wo ich am 4. März 1955 die Reifeprüfung bestand. Danach besichte ich für ein Jahr die Frauenschule Bad Weilbach/Taunus.

Im Sommersemester 1956 begann ich mit dem Studium der Medizin in Tübingen, wo ich im Oktober 1958 das Physikum ablegte. - Nach einem klinischen Semester in München, kehrte ich wieder nach Tübingen zurück und beendete am 22. Dezember 1961 mein Studium mit dem Staatsexamen.

Seit 1. Februar 1962 bin ich an der Universitäts-Frauenklinik in Tübingen als Medizinalassistentin angestellt.